

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**TESIS DOCTORAL**

**Análisis de la neurotoxicidad del  $\beta$ -N-Metilamino-L-Alanina (L-BMAA): estudios en cultivos de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y en cerebelo de rata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Emma Muñoz Sáez**

Directores

Begoña Gómez Miguel  
Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes Portero  
M<sup>a</sup> Teresa Solas Alados

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**

**Departamento de Fisiología Animal II**

**Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)**



**ANÁLISIS DE LA NEUROTOXICIDAD DEL  $\beta$ -N-METILAMINO-L-ALANINA (L-BMAA): ESTUDIOS EN CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y EN CEREBELO DE RATA**

**TESIS DOCTORAL**

**Emma Muñoz Sáez**

**Madrid, 2014**





DRA. BEGOÑA GÓMEZ MIGUEL, profesora titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, DRA. ROSA M<sup>a</sup> ARAHUETES PORTERO, profesora titular del Departamento de Fisiología Animal II, y la DRA. M<sup>a</sup> TERESA SOLAS ALADOS profesora titular del Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica), todas ellas pertenecientes a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

#### CERTIFICAN

Que D<sup>ña</sup>. EMMA MUÑOZ SÁEZ, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral, titulado “ANÁLISIS DE LA NEUROTOXICIDAD DEL  $\beta$ -N-METILAMINO-L-ALANINA (L-BMAA): ESTUDIOS EN CULTIVOS DE NEUROBLASTOMA HUMANO (SH-SY5Y) Y EN CEREBELO DE RATA” y que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación.

#### LAS DIRECTORAS

Fdo.  
Begoña Gómez Miguel

Fdo.  
Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes Portero

Fdo.  
M<sup>a</sup> Teresa Solas Alados





*Nacemos para resolver problemas, no para buscar soluciones.  
Lo complicado del aprendizaje es hacer las preguntas adecuadas.  
(Eduardo Punset)*

*A mi familia y amigos,*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al cabo de mucho tiempo, sufrimiento, y otras tantas alegrías ha llegado el momento, aquí está mi tesis. Este apartado es el más importante del trabajo, porque sin todos vosotros este sueño no hubiera sido posible. Os pido disculpas por anticipado si me he olvidado de alguien, espero que no me lo tengáis en cuenta, y que la próxima vez que nos veamos me hagáis invitaros a tomar algo por no incluíros.

Inicialmente, me gustaría mencionar a los impulsores y financiadores de toda esta aventura, comenzando por la Fundación MEDINA, continuando por el CSIC y finalizando por FUNDELA. Gracias a todos por el apoyo que habéis mostrado para el grupo ELA-UCM porque habéis confiado en nosotras desde el primer momento, y creo que juntos hemos obtenido resultados muy prometedores.

Mi devoción por la biología comenzó muy temprano, ya desde el cole el Conocimiento del Medio era lo mío. Gracias a Carol Sanz por nuestros miércoles de español, y de deberes juntas; a Pati García, porque hemos compartido tantos momentos de tortitas, y a vuestras familias, por tener siempre unas palabras de cariño para mí. Gracias a mi padri, David que siempre ha apoyado mi trabajo. Así llegamos a una etapa muy feliz de mi vida, recogiendo el agua de lluvia del pluviómetro del insti en los recreos, asistiendo a prácticas de biología extras en segundo de bachillerato, y esa primera electroforesis. Eso marcó una diferencia en mi vida, todo gracias a un gran profesor de Biología, si si, no mires para otro lado Jesús Martín Freire, tú has sido el culpable de que me embarcara en una Licenciatura en Ciencias Biológicas. No se me ocurre mejor agradecimiento a tu gran labor docente, que esta tesis.

Parece que fue ayer ese primer día de facultad, con Sus Ortiz, que incluso hicimos la selectividad juntas. Los primeros pasos en la facul con la primera persona a la que conocí, Marta Pina, y luego con todos vosotros, en el turno de tarde de primero en la 3204-A. Al final la carrera se ha convertido en un periodo de construcción de una gran familia, porque la verdad es que os veía más durante esos años que a mi familia. Gracias por tantos días de biblioteca a Miguel Ángel, Félix, Elena, Sara, Virginia, Sandra, Selene, Lorena, Antonio, Marisa, Laura, Pilar, Merce, Carolina, Patricia, Aránzazu, Fer, Alejandro, Darío, Jose...

Nuestro viaje a Túnez, las troncales que han sido increíbles, y todas las experiencias vividas han servido para sacar lo mejor de nosotros mismos. Jota, porque ya sabes que sin tu humor la carrera habría sido muuuy aburrida; Carlos, por toda la información que nos aportas; Alicia, por compartir con nosotros tu ilusión investigadora y Belén, porque dentro de poco las dos seremos doctoras. Gracias por apoyarme y caminar a mi lado todos los días, dentro y fuera de la facultad. Conchi, para tí una mención especial. Porque tú sabes que eres imprescindible para mí, gracias

por todos los momentos que hemos vivido juntas. Sin tu apoyo, y tu hospedaje para los días de fiesta nada de esto habría sido igual. Quiero agradecer también a Currinchi y a Víctor el hacerme sentir bienvenida siempre que voy a tu casa.

Durante el verano de 2008, inicié mi andadura como investigadora trabajando en la planta 13 con la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Arahetes gracias a la Beca de Colaboración en Departamentos del Ministerio. Gracias Alba por enseñarme todo lo que sabías y por inculcarme tu sabiduría y tú buen hacer desde el principio. Gracias a Ana José por el gran legado que nos dejó en el labo, con un Reference Manager por rellenar y muchos productos para inventariar. Allí, conocí a Estefanía, que se convirtió en una parte indispensable de mí día a día. Eres la persona más perfeccionista que conozco. Gracias por compartir esta batalla conmigo, incluyendo experimentos y otras experiencias vitales. Y sobre todo, gracias por enseñarme toda la Neuro que sé, es un mundo fascinante.

Luego vino más gente a trabajar en el grupo, llegó Irene y con ella se nos escaparon por primera y última vez nuestras ratas. Menuda bienvenida al labo, jajaja. Muchas gracias por enseñarme tanto inglés corrigiendo mi TFM. Tengo una visita pendiente a Suiza para veros a Pablo y a ti. Al año siguiente llegaron, Petr y Andreia, muchas gracias por ayudarnos con los animales y con el mantenimiento de los cultivos, espero que aprendierais mucho. A todos los que estáis por venir, y a mis alumnos del cole, espero que esta tesis os inspire en vuestra carrera investigadora.

Al departamento de Fisiología Animal II por acogerme con los brazos abiertos, y en especial a Ana, nuestra secretaria. A las Teresas por vuestra disposición a ayudar, y a Eva por todos los trámites. A la Dra. Meritxel López Gallardo y sus chicos por enseñarnos a manejar la inmunohistoquímica. Al departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica) también ha sido testigo de esta historia, gracias a todos. Gracias también al departamento de Bioquímica Biología Molecular I por brindarme la oportunidad de compartir con vosotros el Máster y esta tesis. A Ana por ser nuestro contacto en la Fundación, a Inma, y en especial a Lola, por vivir conmigo mis primeras horas de labor docente. A Mayte Villalba por acordarse de mí y brindarme la oportunidad de ejercer como docente en el Colegio Virgen de Europa. Ah! y a los José Luises por añadir un vacile a los momentos más tensos de la tesis.

Los Centros de Apoyo a la Investigación de la UCM han tenido un papel crucial en esta tesis. Gracias al CAI de Microscopía Electrónica y en especial a Marisa y a Agustín por su maña con el electrónico y el soporte que nos han brindado; y a Alfonso por las preciosas imágenes de confocal. Gracias al CAI del Animalario de CC. Biológicas, y en concreto a Verónica, Carmensa, Antonio, Stella y especialmente a Eva, gracias por cuidar tanto de las ratas como de nosotras. Sin vuestro buen hacer y vuestra experiencia esta experimentación no hubiera sido posible.

A mis tres directoras de tesis. A Maite, por transmitirnos tus conocimientos sobre la microscopía electrónica, ¡es un mundo tan bonito! A Rosa, que has sido como una madre para mí, gracias por enseñarme tantas cosas a lo largo de estos 6 años. A Begoña, mi directora de tesis, por ser un ejemplo para mí, tanto desde el punto de vista científico como desde el punto de vista humano. Eres la mujer más luchadora que he conocido, gracias por facilitarme las cosas y dirigir el comienzo de mi carrera investigadora. Gracias a las tres por luchar para sacar adelante nuestros objetivos en estos tiempos tan duros

A mi familia, Luismis pequeño y grande, Álvaro, Miguel, Mariano, Margui, Iván, Paco... Agradecimiento especial a mi tía Tere, porque eres la imprescindible de la familia, y siempre nos apoyas con todas las decisiones que tomamos. A mi primo Chemi por tus visitas a casa y por volver loco a Zeus. Y gracias a tu mujer Jessi, que es casi tan increíble como tú. A Faty y a Alex por ser los mejores padres que Laura puede tener. A Laura, porque has nacido durante este proyecto y aunque ahora no lo entiendas, algún día verás lo importante que has sido para tu tita Emma. Porque a la hora de realizar una tesis doctoral todo apoyo es poco, y aunque no pertenezcáis al mundo científico me habéis dado fuerzas para hacer realidad mis sueños, ¡Gracias familia!

En tiempos difíciles como los que corren, embarcarse en una aventura de estas dimensiones y tener a gente que te apoya hace que te sientas muy especial. A mis golfos favoritos, que sin ellos no soy nadie. A mi madre, Rosy, porque siempre tiene una palabra de ánimo en los días más difíciles. Y a mi padre, Julián, por inculcarme esa paciencia que en la ciencia juega un papel tan importante. A mi hermano Héctor y su novia Marta, porque sé que al cumplir mis sueños cumplo parte de los tuyos Tito. A mi abuelita, María Antonia, por vivir esta experiencia conmigo y siempre tener una palabra de cariño para mí. Y gracias también a mi futura familia política, porque todos habéis caminado a mi lado.

A ti, Alex, porque eres especial y lo sabes. Muchísimas gracias por ayudarme en todo momento con el maquetado de la tesis y con la portada. Pero especialmente gracias por vivir la vida a mi lado, y por compartir conmigo esta aventura y apoyarme en todo momento, que ya sabes que la investigación es muy sacrificada y tú me lo pones más fácil día a día. Creo que tendremos que celebrarlo con un Brownie para el Sr. León. Gracias por tanto, ¡Te quiero!

Todo final de etapa implica el principio de una nueva. Espero que éste sea el principio de mi carrera investigadora.

A todos,

Gracias



## RESUMEN

### Introducción

El N- $\beta$ -metilamino-L-alanina (L-BMAA) tiene una acción excitotóxica y produce neurotoxicidad, por lo que se ha relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas (Dawson *et al.*, 1998). En los habitantes indígenas de la isla de Guam, en el océano Pacífico, se ha encontrado una alta incidencia de la patología denominada Complejo Esclerosis Lateral Amiotrófica/Parkinson-Demencia (ELA/PDC) (Whiting, 1988; Karamyan y Speth, 2008). La explicación más plausible de este suceso se debe a que los individuos que habitaban en la isla recibían dosis suficientes de L-BMAA como para inducir ELA/PDC. La bioamplificación de este aminoácido a través de la cadena trófica revela que la cantidad de L-BMAA unido a proteínas es entre 60 y 130 veces mayor que el aminoácido libre encontrado (Murch *et al.*, 2004a, b). Esto produce un reservorio endógeno de neurotoxina en los organismos que puede ser liberado de forma lenta y progresiva a otros tejidos durante el catabolismo proteico durante décadas después de la ingestión del L-BMAA (Murch *et al.*, 2004b; Cucchiaroni *et al.*, 2010).

Debido a su similitud estructural con el glutamato, el L-BMAA va a ser un desencadenante de desórdenes neurodegenerativos causando alteraciones en el interior de las células, como son un incremento del estrés oxidativo, una disfunción mitocondrial, la alteración de la síntesis y degradación proteica y el desequilibrio de algunas enzimas. Además, es importante destacar que el L-BMAA va a ser incorporado a proteínas (Dunlop *et al.*, 2013) alterando la homeostasis proteica. Las neuronas son especialmente susceptibles a daños en el plegamiento proteico y la acumulación de proteínas aberrantes dado que no realizan división celular.



El cerebelo es un centro motor subcortical muy importante que asegura que los movimientos sean realizados con precisión espacial y temporal (Ito, 1984). Las lesiones cerebelares no suelen causar parálisis pero sí desordenes relacionados con la ejecución de movimientos precisos, mantenimiento del equilibrio, la postura y el aprendizaje motor. Sería interesante considerar que el L-BMAA afecta al cerebelo de las ratas de igual manera que afecta a otras zonas de Sistema Nervioso Central como son la corteza motora primaria y la médula espinal.

### **Objetivos**

Analizar la citotoxicidad causada por el L-BMAA en tres sistemas: un cultivo de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) con el que establecimos las bases de la neurodegeneración que causa este aminoácido, por otro lado se realizaron ensayos con tratamientos *in vivo* con el L-BMAA en ratas para evaluar la afectación cerebelar y también se hicieron estudios incubando con L-BMAA cortes de cerebelo para descifrar el mecanismo de acción del tóxico en un sistema que no sea una línea celular inmortalizada en el que poder analizar el papel neuroprotector de moléculas potencialmente terapéuticas como es la esfingosina-1-fosfato.

### **Materiales y métodos**

Se han empleado distintas técnicas para la obtención de los objetivos propuestos. Para ello se han combinado experimentos en los tres sistemas utilizados en la presente tesis. Para los tres sistemas han sido llevados a cabo análisis por western blot, y análisis estadísticos de cada uno de los datos obtenidos en el laboratorio. Para la experimentación con la línea celular SH-SY5Y ha sido fundamental el establecimiento de las condiciones de cultivo y la adecuación de un correcto diseño experimental. Se han llevado a cabo ensayos de viabilidad, análisis de la muerte celular por citometría de

flujo y el marcaje con sondas fluorescentes indicadoras de daño neuronal. En el caso de los estudios *in vivo* de animales tratados con L-BMAA ha sido de vital importancia el manejo correcto de la cirugía así como el manejo de la inmunofluorescencia e inmunohistoquímica tanto para realizar estudios de microscopía confocal como de microscopía electrónica. Y por último, para los cortes de cerebelo de rata tratados con L-BMAA, el establecimiento de las condiciones de incubación con L-BMAA de los cortes así como la viabilidad durante la incubación ha sido la clave para la obtención de los resultados presentados en este trabajo.

## **Resultados**

El tratamiento con L-BMAA en células SH-SY5Y y en cortes de cerebelo produce un incremento de la muerte celular. Además, las ratas tratadas con L-BMAA muestran una afectación neurológica más elevada que los animales control. El L-BMAA va a alterar los niveles de los ROS y aumenta la capacidad antioxidante total del tejido cerebelar. También han sido registradas alteraciones mitocondriales en las neuronas, así como una afectación de la vía secretora, en las que el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi se muestran desestructurados en los animales tratados con L-BMAA. Como respuesta al tratamiento con L-BMAA en los tres sistemas empleados en la presente tesis se han obtenido alteraciones en dos biomarcadores, GSK3 $\beta$  y TDP-43. El proceso autofágico también parece estar implicado en los procesos neurodegenerativos que acontecen tras el tratamiento con L-BMAA, obteniéndose un incremento de LC3B en las células de Purkinje. Se han realizado ensayos de neuroprotección con las moléculas IGS2.7, IGS2.55, IGS2.44, DIP5.5 (inhibidores de CK-1), la taurina, el ácido isolecanórico (inhibidor de GSK3) y la S1P. Los resultados muestran que estas moléculas protegen de la muerte celular de las células SH-SY5Y causada por el L-BMAA. En los cortes de

cerebelo incubados con VP2.51 (inhibidor de GSK3) se protege parcialmente de la muerte celular y si se suministra a ratas que previamente fueron intoxicadas con L-BMAA, es capaz de disminuir los procesos autofágicos que desencadena el aminoácido excitotóxico. Por su parte, la S1P promueve una disminución de la necrosis y protege del aumento GSK3 $\beta$  producido por el L-BMAA, actuando sobre la vía canónica de supervivencia celular de PI3K.

### **Conclusiones**

- Las células de neuroblastoma tratadas con L-BMAA, se podrían proponer como un modelo celular para el estudio tanto de los mecanismos de procesos neurodegenerativos, como para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas.
- Queda demostrado el daño cerebelar causado en ratas tras el tratamiento con L-BMAA. Las ratas afectadas no pueden reestablecer las funciones normales del cerebelo, con respecto a la coordinación motora y al control postural.
- Los cortes cerebelo tratados con L-BMAA constituyen un método sencillo y válido para el estudio tanto de mecanismos de procesos neurodegenerativos como para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas.

### **Bibliografía**

Cucchiaroni M.L., Viscomi M.T., Bernardi G., Molinari M., Guatteo E., Mercuri N.B. (2010).

Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J Neurosci.* 30 (15): 5176-5188.

Dawson R. Jr., Marschall E.G., Chan K.C., Millard W.J., Eppler B., Patterson T.A.(1998).

Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of beta-N-

methylamino-L-alanine and 3,3'-iminodipropionitrile. *Neurotoxicol Teratol.* 20 (2): 181-192.

Dunlop R.A., Cox P.A., Banack S.A., Rodgers K.J. (2013). The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One.* 8 (9): e75376.

Ito M. (1984). *The cerebellum and neural control.* New York: Raven Press.

Karamyan V.T., Speth R.C. (2008). Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82 (5-6): 233-246.

Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A. (2004a). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (33): 12228-12231.

Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A., Steele J.C., Sacks O.W. (2004b). Occurrence of b-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110 (4): 267–269.

Whiting, M.G. (1988). Toxicity of cycads: implications for neurodegenerative diseases and cancer. *Transcripts of Four Cycad Conferences. The First Cycad Conference: 1962.* Third World Medical Research Foundation, New York, pp. 1–17.



## ABSTRACT

### Introduction

The N- $\beta$ -methylamino-L-alanine (L-BMAA) has excitotoxic action and produce neurotoxicity, so it has been linked to the onset of neurodegenerative diseases (Dawson *et al.*, 1998). In the indigenous population of the island of Guam in the Pacific Ocean have been found a high incidence of one disease called Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson-dementia Complex (ALS/PDC) (Whiting, 1988; Karamyan and Speth, 2008). The most plausible explanation for this event is that individuals who lived on the island received enough doses of L-BMAA to induce ALS/PDC. The biomagnification of this amino acid through the food chain reveals that the amount of L-BMAA bounded to proteins is between 60 and 130 times larger than the free amino acid form (Murch *et al.*, 2004a,b). This fact produces a neurotoxin endogenous reservoir inside organisms. This aminoacid can be released slowly and gradually to other tissues during decades after ingestion of L-BMAA due to protein catabolism (Murch *et al.*, 2004b; Cucchiaroni *et al.*, 2010).

Due to its structural similarity to glutamate, L-BMAA will be a trigger for neurodegenerative disorders caused by changes in the intracellular medium, such as increased oxidative stress, mitochondrial dysfunction, impaired synthesis and protein degradation and the imbalance of some enzymes. It is also important to note that L-BMAA will be incorporated into proteins (Dunlop *et al.*, 2013) causing the alteration of protein homeostasis. Neuron cells are particularly susceptible to suffer damage in protein folding and protein accumulation because it has not performed cellular division. The cerebellum is one of the most important subcortical motor centers which ensure that the movements are performed with spatial and temporal precision (Ito, 1984).

Cerebellar lesions rarely cause paralysis but it can imply disorders related to precise movements executing, balance maintaining, posture control, and motor learning. It would be interesting to consider that L-BMAA affects the cerebellum of rats in a similar way in which it affects other areas of the central nervous system such as the primary motor cortex and spinal cord.

## **Objectives**

To analyze the cytotoxicity caused by L-BMAA in three systems: a culture of human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) in which we established the bases of neurodegeneration caused by this amino acid, other assays were performed with *in vivo* rat treatment with L-BMAA where we studied cerebellar involvement assessing expression and finally, we carried out studies by incubating cerebellum slices with L-BMAA cerebellum in order to figure out the action mechanism of the toxin in a different system rather than an immortalized cell line and in which we analyzed the neuroprotective role of potentially therapeutic molecules such as sphingosine-1-phosphate.

## **Materials y methods**

In order to obtain the objectives described above, we have used different techniques. We have been done experiments in the three different systems. For all of them, we have been performed western blot analysis, and a statistical analysis has been made for each data obtained in the laboratory. Regarding the work carried out in the SH- SY5Y cell line was essential to establish the culture conditions and a properly experimental design. Moreover, we made viability assays, cell death analysis by flow cytometry and fluorescent labeling probes which are markers of neuronal damage. Concerning *in vivo* studies of L-BMAA treated animals, a proper management of surgery and the

management of both immunofluorescence and immunohistochemistry by confocal microscopy and electron microscopy have been of vital importance. Finally, regarding rat cerebellar slices treated with L-BMAA, the establishment of the proper conditions for L-BMAA incubation and the viability during the process have been the key to the results presented in this work.

## **Results**

The treatment with L-BMAA in SH-SY5Y cells in cerebellar slices causes an increased cell death. Moreover, rats treated with L-BMAA show a higher neurological evaluation than control animals and it had been demonstrated a cerebellar damage affecting motor coordination and posture control. The L-BMAA will change the levels of ROS and increases the total antioxidant capacity of cerebellar tissue. We have also been recorded mitochondrial alterations in neurons, and an impairment of the secretory pathway, in which endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are disorganized in animals treated with L-BMAA. In response to the treatment with L-BMAA in the three systems studied in this thesis we obtained two biomarkers alterations, GSK3 and TDP-43. Autophagy also appears to be involved in neurodegenerative processes which occur after the treatment with L-BMAA, yielding LC3B increased in Purkinje cells. We carried out neuroprotective assays using molecules IGS2.7, IGS2.55, IGS2.44, DIP5.5 (inhibitors of CK-1), taurine, isolecanoric acid (inhibitor of GSK3) and S1P. All of them protect from cell death caused by L-BMAA in the cellular line SH-SY5Y. In cerebellar slices incubated with VP2.51 (GSK3 inhibitor) are partially protected from cell death and, in rats previously treated with L-BMAA, VP2.51 is capable of reducing the autophagic process. Meanwhile, the S1P promotes a decreased necrosis and protects GSK3 increase produced by the L-BMAA, acting on the canonical cell survival pathway PI3K/Akt.



## **Conclusions**

- Neuroblastoma cells treated with L-BMAA could be proposed as a cellular model for studying mechanisms of both, neurodegenerative processes and for testing potential therapeutical molecules.
- This work is an evidence of cerebellar damage in rats after treatment with L-BMAA. Rats affected cannot restore the normal functions of the cerebellum, regarding to motor coordination and postural control.
- Cerebellum slices treated with L-BMAA provide a simple and valid method for the study of neurodegeneration mechanisms as well as an important tool for testing potential therapeutical molecules.

## **Bibliography**

- Cucchiaroni M.L., Viscomi M.T., Bernardi G., Molinari M., Guatteo E., Mercuri N.B. (2010). Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J Neurosci.* 30 (15): 5176-5188.
- Dawson R. Jr., Marschall E.G., Chan K.C., Millard W.J., Eppler B., Patterson T.A.(1998). Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of beta-N-methylamino-L-alanine and 3,3'-iminodipropionitrile. *Neurotoxicol Teratol.* 20 (2): 181-192.
- Dunlop R.A., Cox P.A., Banack S.A., Rodgers K.J. (2013). The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One.* 8 (9): e75376.
- Ito M. (1984).The cerebellum and neural control. New York: Raven Press.

Karamyan V.T., Speth R.C. (2008). Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82 (5-6): 233-246.

Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A. (2004a). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (33): 12228-12231.

Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A., Steele J.C., Sacks O.W. (2004b). Occurrence of b-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110 (4): 267–269.

Whiting, M.G. (1988). Toxicity of cycads: implications for neurodegenerative diseases and cancer. *Transcripts of Four Cycad Conferences. The First Cycad Conference: 1962. Third World Medical Research Foundation, New York, pp. 1–17.*



## **ÍNDICE**



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>29</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>33</b>
1.1. B-N-metilamino-L-alanina .....	35
1.2. Guam y el Complejo Esclerosis Lateral Amiotrófica/Parkinson-Demencia (ELA/PDC).....	35
1.3. Cianobacterias y amplia distribución del L-BMAA .....	40
1.4. Enfermedades neurodegenerativas.....	41
1.5. L-BMAA reservorio neurotóxico y mecanismo de acción.....	46
1.6. Predisposición genética al daño por L-BMAA.....	51
1.7. Alteraciones características de neurodegeneración.....	52
1.7.1. Estrés oxidativo.....	52
1.7.2. Disfunción mitocondrial .....	53
1.7.3. Estrés del Retículo Endoplásmico y enfermedades neurodegenerativas.....	55
1.7.4. Aparato de Golgi y neurodegeneración .....	56
1.7.5. Autofagia .....	57
1.8. Afectación del cerebelo causada por el L-BMAA .....	60
1.9. Biomarcadores de neurodegeneración.....	62
1.9.1. GSK3 .....	63
1.9.2. TDP-43 .....	67
1.10. Neuroprotectores .....	70
1.10.1. Esfingosina 1 fosfato .....	70
1.10.2. Taurina.....	73
1.10.3. Inhibidores de GSK3 .....	74
1.10.4. Inhibidores de caseína quinasa.....	75
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>77</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>81</b>
3.1. Experimentación realizada con una línea celular.....	83
3.1.1. Línea celular y condiciones de cultivo .....	83
3.1.2. Diseño experimental general para los ensayos celulares.....	83
3.1.3. Ensayos de viabilidad celular por MTT .....	85
3.1.4. Medida de los tipos de muerte celular por citometría de flujo .....	86

3.1.5. Marcaje con sondas, microscopía confocal y lector de fluorescencia.....	87
3.1.6. Generación de especies reactivas de oxígeno .....	88
3.1.7. Potencial de membrana mitocondrial .....	89
3.1.8. Medida de calcio mitocondrial.....	89
3.1.9. Fraccionamiento subcelular para valorar GSK3 .....	89
3.1.10.Extracción de proteínas insolubles para valorar TDP-43 .....	90
3.2. Estudios <i>in vivo</i> de animales tratados con L-BMAA .....	91
3.2.1. Obtención de cerebelo para análisis de GSK3 $\beta$ yTDP-43 por western blot.....	93
3.2.1.1. GSK3 $\beta$ .....	94
3.2.1.2. TDP-43 .....	94
3.2.2. LC3B .....	95
3.2.3. Perfusión de rata para inmunohistoquímica de fluorescencia .....	95
3.2.4. Perfusión de rata para microscopía electrónica .....	97
3.2.4.1. Muestras para microscopía electrónica convencional .....	98
3.2.4.2. Muestras para inmunohistoquímica .....	98
3.3. Estudios en cortes de cerebelo de rata tratados con L-BMAA .....	99
3.3.1. Extracción de tejidos y tratamientos aplicados .....	99
3.3.2. Medida de viabilidad celular en los cortes de cerebelo .....	100
3.3.3. Fraccionamiento subcelular para valorar GSK3 $\beta$ .....	101
3.3.4. Extracción de proteínas insolubles para valorar TDP-43 .....	102
3.3.5. Medida de la capacidad antioxidante total.....	102
3.4. PAGE-SDS y Western-Blot.....	103
3.4.1. Valoración de proteínas .....	103
3.4.2. Electroforesis y Western-Blot.....	103
3.5. Anticuerpos y diluciones utilizadas.....	105
3.6. Análisis estadístico .....	105
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
4.1. Estudio de la acción del L-BMAA sobre cultivos celulares de neuroblastoma SH-SY5Y .....	109
4.1.1. Viabilidad celular .....	109
4.1.2. Generación de ROS .....	110

4.1.3. Despolarización de la membrana mitocondrial.....	112
4.1.4. Análisis del calcio mitocondrial.....	114
4.1.5. Análisis de GSK3 .....	116
4.1.6. Análisis de TDP-43 .....	118
4.1.7. Estudios de neuroprotección .....	119
4.1.8. S1P como neuroprotector .....	120
4.2. Estudio de la acción del L-BMAA <i>in vivo</i> . Alteraciones en el cerebelo .....	127
4.2.1. Alteraciones ultraestructurales .....	128
4.2.2. Análisis de GSK3 .....	131
4.2.3. Análisis de TDP-43 .....	135
4.2.4. Análisis de la autofagia causada por L-BMAA en las motoneuronas cerebelares .....	139
4.2.5. Efecto protector del inhibidor de GSK3 VP2.51 .....	143
4.3. Estudio de la acción del L-BMAA sobre cortes de cerebelo .....	146
4.3.1. Estudio de la viabilidad celular .....	146
4.3.2. Valoración de la capacidad antioxidante total .....	147
4.3.3. Análisis de GSK3 $\beta$ .....	148
4.3.4. Análisis de TDP-43 .....	150
4.3.5. Efecto protector del inhibidor de GSK3, VP2.51, y del neuroprotector, S1P .....	151
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>155</b>
5.1. El tratamiento con L-BMAA afecta a la viabilidad celular .....	157
5.2. El L-BMAA aumenta la producción de radicales libres de oxígeno .....	161
5.3. Afectación mitocondrial causada por el L-BMAA .....	165
5.4. Alteraciones que produce el L-BMAA en la vía secretora: retículo endoplásmico y aparato de Golgi.....	169
5.5. Análisis de biomarcadores de neurodegeneración .....	172
5.5.1. Análisis de GSK3 .....	172
5.5.2. Análisis de TDP-43 .....	175
5.6. Procesos autofágicos desencadenados por el tratamiento con L-BMAA.....	180
5.7. Estudios de neuroprotección frente al tratamiento con L-BMAA .....	183



5.8.	La S1P como neuroprotector .....	185
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>189</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>195</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>201</b>
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS PUBLICADOS .....</b>	<b>235</b>

## **ABREVIATURAS**



AG: Aparato de Golgi  
AM: Acetometiléster  
AMPA: Receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico  
AMPc: Adenosin monofosfato cíclico  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CHMP2B: Proteína del cuerpo multivesicular cargado 2b  
CK: Caseína quinasa  
CRE:  $\mu$ M equivalentes reductores de cobre  
CREB: Proteína de unión de elementos de respuesta a AMPc  
cyt-c: Citocromo C  
DHR1,2,3: Dihidrorodamina 1,2,3  
DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco  
ELA/PDC: Esclerosis lateral amiotrófica / Parkinson demencia  
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica  
ERAD: Degradación asociada al retículo endoplásmico  
ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares  
FBS: Suero fetal bovino  
FITC: Isotiocianato de fluoresceína  
FUS/TLS: Proteína de unión al ARN de Sarcoma  
GFP: Proteína fluorescente verde  
GSH: Glutación  
GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3  
H<sub>2</sub>DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato  
H<sub>2</sub>O milli Q: Agua destilada ultrapura  
HAT: Transferencia de un átomo de hidrógeno  
IHQ ME: Inmunohistoquímica por microscopia electrónica  
IHQ MF: Inmunohistoquímica por microscopía de fluorescencia  
IP3: Inositol trifosfato  
L-BMAA:  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina  
LC3II: Cadena ligera 3-II asociada a los microtúbulos  
LDH: Lactato deshidrogenasa  
LTD: Depresión a largo plazo  
LTP: Potenciación a largo plazo  
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos  
MAPs: Proteínas asociadas a los microtúbulos  
mGluRs: Receptores metabotrópicos de glutamato

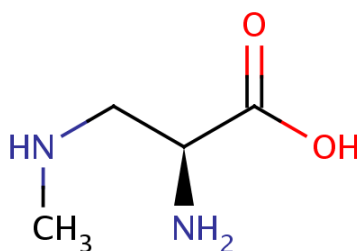
mTOR: Diana en mamíferos de la rapamicina  
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio  
MVBs: Cuerpos multivesiculares  
NADPH diaforasa: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NES: Secuencia de exportación nuclear  
NFAT: Factor nuclear de las células T activadas  
NFH: Cadena pesada de los neurofilamentos  
NLS: Secuencia de localización Nuclear  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
OPTN: Optineurina  
PAGE-SDS: Gel de electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS  
PCTN1: Subunidad p150 de la dinactina  
PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa  
PKC: Proteína quinasa C  
PTx: Toxina pertussis  
RE: Retículo endoplásmico  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RRM: Motivo de reconocimiento de ARN  
RTKs: Receptores tirosina quinasa  
S1P: Esfingosina-1-fosfato  
S1PR: Receptor de Esfingosina 1-fosfato  
SET: Transferencia de un único electrón  
SOD1: Superóxido dismutasa-1  
TDP-43: Proteína de unión al ADN TAR-43  
TMRM: Éster metilo de tetrametilrodamina  
TTBS: Tampón Tris con Tween-20  
UBQLN2: Ubiquilina  
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas  
VAPB: Proteína B de membrana asociada a vesículas  
VCP: Proteína contenedora valosina  
Wrt: Wortmanina

## **1. INTRODUCCIÓN**



### 1.1. B-N-metilamino-L-alanina

El  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido no esencial y no lipofílico que se encuentra en el medio ambiente de forma libre o unido a proteínas (Papapetropoulos, 2007; Brand *et al.*, 2010). Se trata de un  $\alpha$ -aminoácido de estructura similar a la L-alanina pero con uno de sus hidrógenos sustituido por un grupo metilamino (Figura 1). El L-BMAA fue extraído por primera vez por Vega y Bell en 1967 aislándolo de semillas de una planta gimnosperma, *Cycas micronesica* (Vega y Bell, 1967; Vega *et al.*, 1968). El L-BMAA tiene una acción excitotóxica y produce neurotoxicidad, por lo que se ha relacionado con la aparición de enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Dawson *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Estructura química del L-BMAA.

### 1.2. Guam y el Complejo Esclerosis Lateral Amiotrófica/Parkinson-Demencia (ELA/PDC)

Guam es la isla más grande y situada más al sur de las Islas Marianas estadounidenses en el oeste del océano pacífico (Figura 2).





**Figura 2.** Localización geográfica de la Isla de Guam en el Océano Pacífico.

En los habitantes indígenas de esta isla, la tribu de los Chamorro, se ha encontrado una alta incidencia de la patología denominada Complejo Esclerosis Lateral Amiotrófica/Parkinson-Demencia (ELA/PDC). Esta patología está caracterizada por ser un desorden neurodegenerativo similar a la Esclerosis Lateral Amiotrófica y tener estadios caracterizados por síntomas parkinsonianos y demencia (Whiting, 1988; Karamyan y Speth, 2008).

Esta enfermedad aparece afectando a familias completas, aunque hay análisis genéticos detallados que son incapaces de hallar una correlación de ELA/PDC con marcadores genéticos (Morris *et al.*, 1999; Poorkaj *et al.*, 2001). La tasa de progresión y el comienzo de la patología es variable. Existen evidencias clínicas tanto para un comienzo rápido como para un inicio lento de la enfermedad, y la manifestación de los síntomas se puede producir años o incluso décadas tras la exposición al factor causal (Kurland, 1988).

La explicación más plausible de este suceso se debe a que los individuos que habitaban en la isla recibían dosis suficientes de L-BMAA como para inducir ELA/PDC. La base de la alimentación de los Chamorro era la harina procedente de las semillas de *Cycas micronesica*, una palmera común de la región subtropical de Guam, con la que preparaban tortillas (Buenz y Howe, 2007). Además la incidencia de ELA/PDC parece tener fluctuaciones que se sincronizan con variaciones en el uso de las semillas de *Cycas* sp. como base alimenticia de esta población. Durante la ocupación de Guam por el Ejército Japonés (desde 1942 hasta 1944), las semillas de *Cycas* constituyeron uno de

los únicos recursos disponibles para los Chamorro. En la década siguiente a la ocupación, ELA/PDC fue la mayor causa de muerte en Guam (Nunn, 2009).

Uno de los aspectos más intrigantes es el ya mencionado largo periodo de latencia de la enfermedad. Incluso en Chamorros expatriados la incidencia de ELA/PDC es aun 4 veces mayor que en el resto del mundo. Este periodo de latencia condujo a Spencer *et al.* (1991).a sugerir que el L-BMAA funciona como una toxina lenta. La propuesta de Spencer *et al.* (1991) ha sido discutida por Duncan *et al.* (1988), quienes argumentan que el concepto de una neurotoxina lenta no tiene ningún precedente, y que parece que no existe relación entre un componente tóxico de la dieta y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. No se conoce ninguna neurotoxina ambiental que produzca una demora significativa en el comienzo de los síntomas y una enfermedad neurodegenerativa progresiva tras una única exposición al tóxico (Murch *et al.*, 2004a).

Inicialmente se pensaba que el L-BMAA era producido directamente por *Cycas*, aunque esta hipótesis fue reconsiderada ya que: i) los niveles de L-BMAA en la harina realizada a partir de semillas de *Cycas* eran de 50 a 100 veces mayores en su forma unida a proteínas que en su forma libre; ii) el L-BMAA era originado por cianobacterias del género *Nostoc*, que habitan en las raíces de *Cycas* sp. y que proveen a la planta de nitrógeno a través de una vía de fijación de nitrógeno; y iii) la exposición al L-BMAA de los Chamorro se debía al consumo de zorros voladores, unos murciélagos del género *Pteropus*. Estos animales se alimentan de semillas que *Cycas* lo que causa en sus tejidos un incremento de la concentración de L-BMAA de 10.000 veces comparando con los niveles producidos por cianobacterias en las raíces de *Cycas* (Murch *et al.*, 2004a).

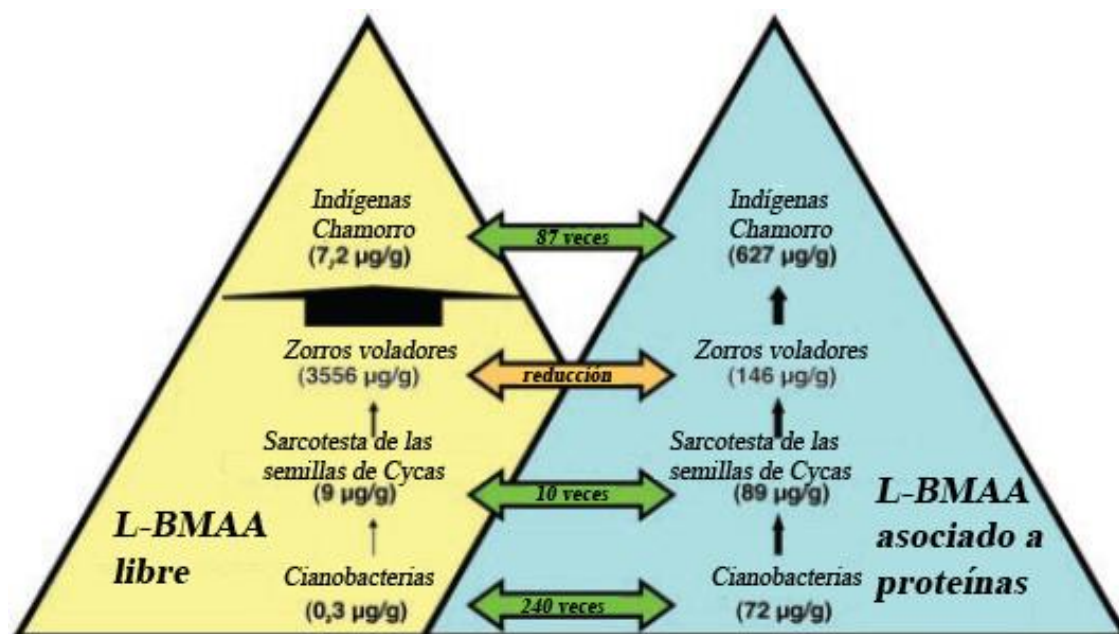
Para hacernos mejor idea de estas cantidades y de cómo el L-BMAA se va amplificando a medida que se asciende en la cadena trófica, a continuación se recogen las cantidades de L-BMAA halladas en cada uno de los organismos analizados (Papapetropoulos, 2007).

Organismo analizado	Cantidad de L-BMAA presente
Cianobacterias de vida libre	0,3 mg/g
Cianobacterias simbiotes de raíces de <i>Cycas</i>	2-37 mg/g
<i>Cycas micronesica</i> (sarcotesta de su semilla)	9 mg/g
<i>Cycas micronesica</i> (capa externa semilla)	1.161 mg/g
<i>Pteropus mariannus</i> , Zorros voladores	3.556 mg/g

**Tabla 1.** Cantidades de L-BMAA encontradas en el ecosistema de Guam.

La bioamplificación que sucede en el ecosistema de Guam implica que con el consumo de un zorro volador la dosis de L-BMAA ingerida es equivalente a comer entre 174 y 1014 Kg de semillas de *Cycas* (Banack y Cox, 2003). Además la autopsia de los pacientes que murieron de ELA/PCD indicó que había niveles de L-BMAA en tejidos cerebrales de alrededor de 6,6 mg/g (Papapetropoulos, 2007).

Se ha encontrado el L-BMAA de dos maneras, en forma libre y unido a proteínas. En general, la cantidad de L-BMAA unido a proteínas es entre 60 y 130 veces mayor que el conjunto encontrado de aminoácido libre analizando los mismos tejidos (Murch *et al.*, 2004a).



**Figura 3.** Pirámide de bioacumulación de L-BMAA en el ecosistema de Guam en su forma libre y unido a proteínas. Figura adaptada de Murch *et al.*, 2004a.

Actualmente existe mucha controversia con respecto a esta hipótesis. Cox *et al.* (2003) han demostrado que las cianobacterias de las raíces de la palmera *Cycas* producen L-BMAA, causando en el sistema nervioso de los habitantes de Guam una bioconcentración hasta desarrollar el desorden neurodegenerativo (Cox *et al.*, 2003; Banack y Cox, 2003; Murch *et al.*, 2004a, b). Adicionalmente, estos autores han demostrado que las cianobacterias que producen L-BMAA son ubicuas alrededor de todo el mundo y además, están asociadas con los afloramientos de algas en áreas geográficas donde se han producido muertes en animales y humanos (Metcalf *et al.*, 2008; Vance *et al.*, 2010; Jonasson *et al.*, 2010).

En las décadas recientes, con la Americanización de la población de la isla y con el descenso del consumo de *Cycas*, la incidencia de ELA/PDC ha disminuido mientras que la aparición de los síntomas entre la población de mediana edad se ha incrementado. Estas observaciones nos llevan a pensar que la hipótesis de un cambio en los patrones de consumo de *Cycas* y la exposición a las cantidades de toxina varía la incidencia de la patología (Nunn, 2009).

Aparte del caso de la Isla de Guam, se han documentado otras poblaciones con alta incidencia de ELA/PDC como los residentes de la Península de Kii en Japón, la

población de Auyu en Irian Jaya (Jonasson *et al.*, 2010), así como poblaciones expuestas a tóxicos medioambientales como jugadores de fútbol italianos (Chiò *et al.*, 2005) o los veteranos de la guerra de golfo (Cox *et al.*, 2009).

### **1.3. Cianobacterias y amplia distribución del L-BMAA**

Las cianobacterias son un grupo de eubacterias caracterizadas por la capacidad de realizar fotosíntesis. Son bacterias Gram negativas con una capa de peptidoglicano en su pared celular particularmente fina. A su vez, las cianobacterias se dividen en 5 grupos, las dos primeros incluyen formas unicelulares y los otros tres formas filamentosas (Stipa *et al.*, 2006).

El género *Nostoc*, mantiene una relación simbiótica con el sistema de raíces coraloides de *Cycas micronesica* y es el responsable de la producción del L-BMAA (Cox *et al.*, 2003; Papapetropoulos, 2007). Este aminoácido ha sido encontrado en un amplio rango de cianobacterias de vida libre, lo cual induce a pensar en su amplia distribución geográfica (Cox *et al.*, 2005; Papapetropoulos, 2007; Metcalf *et al.*, 2008).

El incremento de la demanda de agua así como la presión industrial y la explotación agraria sobre los recursos acuáticos han resultado en una eutrofización y en un incremento de la frecuencia de los afloramientos cianobacterianos (Sivonen y Jones, 1993).

Más recientemente, Cox *et al.* (2005), Banack *et al.* (2007) y Esterhuizen y Downing (2008) publican la variación de la producción de L-BMAA por cianobacterias de vida libre. Cuando desaparece un afloramiento cianobacteriano, el L-BMAA libre y asociado a proteínas puede ser liberado al entorno, estando así disponible para su captura y absorción por otros organismos (Esterhuizen *et al.*, 2011). Así, de manera natural ocurre una bioacumulación a través de la cadena trófica, que bioamplifica las cantidades y la toxicidad de dicho aminoácido. Los datos encontrados sugieren que el L-BMAA puede ser bioacumulado en niveles tróficos superiores, incluyendo peces y moluscos utilizados para el consumo humano (Jonasson *et al.*, 2010).

Por tanto, la ubicuidad de las cianobacterias y su presencia en diversos ambientes tanto del medio acuático como terrestre sugiere que la ingestión del L-BMAA ocurre tanto a

través de la ingestión directa de cianobacterias, de la ingestión de hospedadores de las mismas o de la exposición a recursos acuáticos contaminados por cianobacterias (Bienfang *et al.*, 2011). Este hecho justifica la amplia distribución del aminoácido.

#### **1.4. Enfermedades neurodegenerativas**

Los desórdenes neurodegenerativos son un conjunto heterogéneo de enfermedades cuyo desarrollo suele ser lento y progresivo. Estas enfermedades se caracterizan por una pérdida específica de ciertas poblaciones neuronales generando un cuadro clínico diferente para cada una de ellas. Las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes son la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y el complejo ELA/PDC. El tipo neuronal al que afecta cada una de estas patologías es la causa de la diferencia sintomatológica de cada una de ellas. Por ejemplo, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra afecta al control locomotor y conduce a la enfermedad de Parkinson, mientras que la neurodegeneración de las neuronas motoras, que controlan la contracción del músculo esquelético, conduce a la parálisis progresiva encontrada en los casos de ELA. En estas enfermedades neurodegenerativas, la degeneración neuronal puede ser selectiva o, como sucede en la mayoría de los casos, difusa. En la enfermedad de Alzheimer por ejemplo, la degeneración aparece en toda la corteza cerebral y en algunas regiones subcorticales. En todas las enfermedades neurodegenerativas, la muerte neuronal es un proceso lento, normalmente alcanzan la máxima gravedad sintomática tras décadas de vida desde el establecimiento de la patología (Dupuis, 2013). Un factor común de todas estas patologías neurodegenerativas, es la excitotoxicidad que juega un papel fundamental ya que altera la homeostasis celular, y desencadena procesos de muerte celular.

Así, en el caso de las ataxias cerebeloespinales, caracterizadas por el desequilibrio y la descoordinación de los pacientes (Almeida-Silva *et al.*, 2013), se observa que existe una pérdida neuronal selectiva importante que varía en función del tipo de ataxia. Además, las áreas cerebelares afectadas, se comunican con otras zonas cerebrales y pueden generar procesos excitotóxicos menos selectivos generando daños mayores (Rüb *et al.*, 2013).

En el caso de la enfermedad de Huntington, caracterizada por una disfunción cognitiva, psiquiátrica y motora, además de la acumulación deletérea de la proteína huntingtina, también acontecen alteraciones en la homeostasis del calcio, y se producen sinapsis anómalas como consecuencia de dicha excitotoxicidad. Además de haberse visto afectados los ganglios basales y el estriado, a la patología contribuye de manera significativa la gran pérdida de células de Purkinje en los pacientes en estadios iniciales de la patología (Dougherty *et al.*, 2012a, b).

Por otro lado, la enfermedad de Alzheimer constituye una de las principales causas de demencia, y al igual que en casos anteriores, una característica de esta patología es la acumulación de la proteína  $\beta$ -amiloide. El estrés oxidativo juega un papel importante en esta enfermedad, desencadenando en último término la muerte celular por excitotoxicidad. Se han encontrado también alteraciones en las células de Purkinje que revelan cambios morfológicos relacionados con una disminución en la arborización dendrítica de estas células, lo que está íntimamente relacionado con defectos cognitivos en el equilibrio y en la coordinación del movimiento (Mavroudis *et al.*, 2013).

Por su parte, la enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa cuya progresión es lenta y se caracteriza por rigidez, espasmos involuntarios e hiperactividad. En este caso la proteína acumulada erráticamente es la parkina y esta patología conduce a fenómenos excitotóxicos que desencadenan una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Yang *et al.*, 2013).

De entre todas las patologías neurodegenerativas que implican procesos excitotóxicos nos vamos a centrar en el complejo ELA/PDC, y más concretamente en la ELA, ya que se dispone de más datos de esta enfermedad y se ha demostrado que existe una conexión directa entre la administración de L-BMAA, y la generación de excitotoxicidad desencadenando una patología que mimetiza los principales síntomas descritos para la ELA (Nunn y Ponnusamy, 2009).

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), también denominada enfermedad de las motoneuronas, enfermedad de Charcot o enfermedad de Lou Gehrig, es un término usado para cubrir el espectro de síndromes neurodegenerativos caracterizados

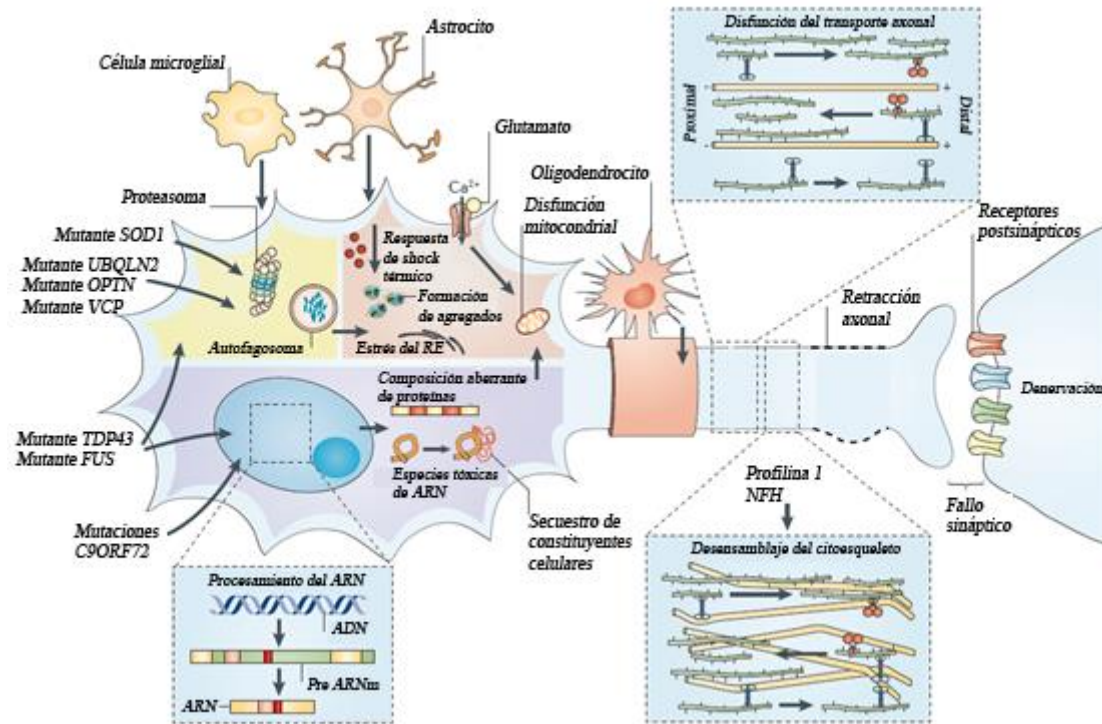
principalmente por una progresiva degeneración de las motoneuronas (Wijesekera y Leigh, 2009).

Esta degeneración se debe principalmente a una pérdida de motoneuronas del córtex motor primario, tronco cerebral y médula espinal. La denominación “Amiotrófica” se refiere a la atrofia de las fibras musculares, que son denervadas al mismo tiempo que el asta celular correspondiente degenera, conduciendo a una debilidad de los músculos afectados y una fasciculación visible de los mismos. “Esclerosis Lateral” hace referencia al endurecimiento de los tractos corticoespinales anterior y lateral y cómo las motoneuronas de esas áreas degeneran y son reemplazadas por gliosis (Wijesekera y Leigh, 2009).

Como consecuencia de la pérdida de motoneuronas, es una enfermedad progresiva, y muy severa caracterizada por: debilidad, espasticidad, pérdida de musculo esquelético, parálisis eventual de movimiento, del habla, del tragado y fallos respiratorios. Los pacientes mueren generalmente de fallo respiratorio durante los 3 o 5 años tras la aparición de los síntomas (Rowland y Shneider, 2001; Chen *et al.*, 2010).

En cuanto a su patogénesis, en el interior de las motoneuronas cabe destacar la presencia de eventos anómalos como la desregulación de la homeostasis proteica celular, la afectación del proceso de autofagia, la formación de agregados proteicos, el estrés del retículo endoplásmico, la disfunción mitocondrial, la formación de proteínas aberrantes, la disfunción del transporte axonal y el desensamblaje del citoesqueleto, así como el fallo sináptico (Robberecht y Philips, 2013).





**Figura 4.** Panorámica de los eventos que acontecen en la ELA. Figura adaptada Robberecht y Philips, 2013.

Tal y como se representa en la Figura 4, la ELA está relacionada con mutaciones en diferentes proteínas. Las mutaciones en la superóxido dismutasa 1 (SOD1), la proteína contenedora valosina (VCP), ubiquilina 2 (UBQLN2), la proteína del cuerpo multivesicular cargado 2b (CHMP2B), la optineurina (OPTN) y potencialmente, la proteína de unión al ADN TAR 43 (TDP43) y FUS cuyas mutaciones causan interferencias con la degradación de proteínas por el proteasoma o por la vía autofágica. Por otra parte en la ELA se producen alteraciones en el procesamiento normal del ARN, que conllevan el ensamblaje de proteínas erróneas y especies tóxicas de ARN. Estos hechos son causados por mutaciones en el marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9ORF72) y potencialmente en TARDBP, que codifica para TDP-43, y FUS. Estos cambios patogénicos primarios resultan en un fallo celular progresivo (sombreado rojo) que consiste en un aglutinamiento de proteínas, la formación de agregados, el estrés del retículo endoplásmico (RE), disfunción del aparato de Golgi (AG) y de las mitocondrias. La arquitectura axonal (citoesqueleto) y su función (transporte) fallan, y aparece una retracción axonal que resulta en la denervación de las neuronas (así como en las motoneuronas inferiores) o el músculo. Las células no neuronales modifican este

proceso a través de la pérdida de sus efectos normales sobre la neurona y/o la ganancia de un efecto tóxico. Factores de vulnerabilidad como son la capacidad de respuesta a estrés (por ejemplo, por la capacidad de activar proteínas de choque térmico) y la susceptibilidad a la excitotoxicidad (por ejemplo, a través de las características de permeabilidad del receptor de glutamato) determinan, o co-determinan qué neuronas son principalmente susceptibles a estos procesos. Algunas proteínas mutadas que causan ELA pueden actuar en niveles más bajos de la señalización en este modelo (por ejemplo, la profilina1 y la cadena pesada de neurofilamentos, NFH, a través de efectos directos en el citoesqueleto y la oxidasa de D-aminoácidos en excitotoxicidad). Sistemas de atracción axonal (como por ejemplo, semaforinas y el factor de crecimiento endotelial) y sistemas de repulsión (por ejemplo, NOGO y efrinas) parecen modificar el proceso de la retracción axonal y la denervación.

Los casos de ELA se pueden dividir en dos subgrupos:

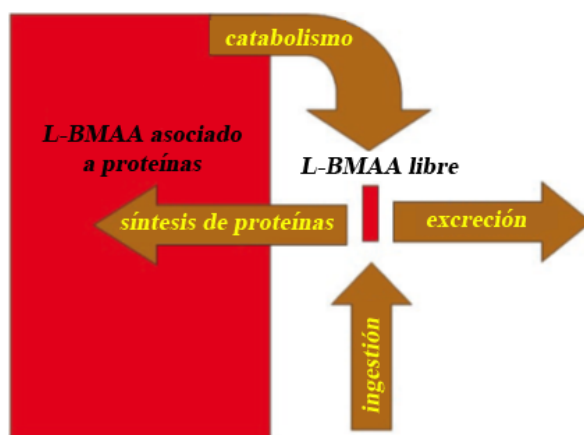
- a) La ELA genética, que engloba al 5-10% de las personas diagnosticadas, de entre ellos el 20% de las mutaciones registradas son mutaciones de la enzima superóxido dismutasa-1 (SOD1). Otros genes alterados menos frecuentemente incluyen mutaciones que afectan a proteínas G, a la proteína B de membrana asociada a vesículas (VAPB), a la senataxina, a la subunidad p150 de la dinactina (DCTN1), a la angiogenina, y a las proteínas de procesamiento de ARN recientemente descubiertas, TDP-43 y FUS/TLS (Shi et al., 2010b).
- b) La ELA esporádica (Barber y Shaw, 2010) reúne el 90% de los diagnósticos, y en este caso la etiología de la enfermedad es desconocida, aunque se han registrado una serie de factores medioambientales que también pueden conducir al desarrollo de la patología (Wijesekera y Leigh, 2009). Alguno de estos factores medioambientales son: factores de la dieta, elevada actividad física, la exposición a toxinas y químicos usados en agricultura, y ser fumador (Wijesekera y Leigh, 2009; Stipa *et al.*, 2006). Diferentes estudios avalan una alta incidencia de ELA en ganaderos, granjeros y gente expuesta a químicos agrícolas, sugiriendo que el suelo es el elemento común de todos ellos pudiendo jugar un papel importante en la etiología de la enfermedad (Stipa *et al.*, 2006).

Se ha encontrado una estrecha relación entre la incidencia de ELA y la práctica de deportes. Entre las posibles causas de este factor de riesgo cabe destacar: el dopaje entre los deportistas de élite usando anti-inflamatorios que suprimen la acción glial, los traumatismos crónicos, el extremado esfuerzo físico que incrementa el estrés oxidativo y el contacto con el suelo que tiene muchas toxinas medioambientales, así como fertilizantes y herbicidas (Chiò *et al.*, 2005). Como ya se ha mencionado a la ELA también se le denomina enfermedad de Lou Gehrig, ya que este jugador de béisbol de los New York Yankees, murió de la enfermedad en 1941 (Stipa *et al.*, 2006).

La ELA es una enfermedad ubicua, y presenta una mayor prevalencia en varones (3 varones por cada 2 mujeres que la padecen). La patología está caracterizada por un comienzo de los síntomas a una edad avanzada (entre los 50 y los 60 años de edad) y el progreso de los síntomas es rápido (Stipa *et al.*, 2006; Barber y Shaw, 2010). La incidencia de la ELA esporádica es de 1-2 por cada 100.000 habitantes en la mayoría de la población (Kurtzke, 1982; Pesiridis *et al.*, 2009), aunque se han registrado excepciones como son la isla de Guam del oeste del pacífico, y la península de Kii en Japón, así como en colectivos como los veteranos de la guerra del golfo y algunos grupos de atletas (Chiò *et al.*, 2005) donde la incidencia es mucho más elevada (Barber y Shaw, 2010).

### **1.5. L-BMAA reservorio neurotóxico y mecanismo de acción**

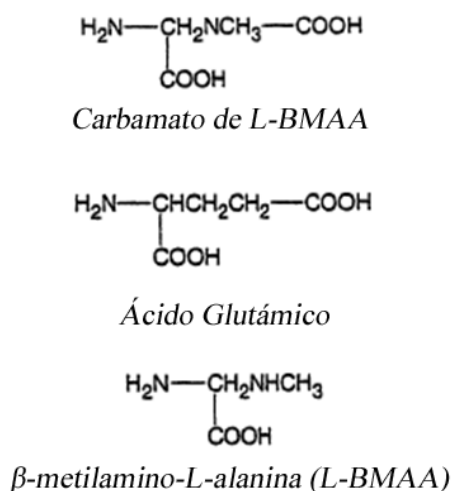
Como ya hemos mencionado, el L-BMAA se puede acumular en bacterias, plantas, animales y tejidos humanos como un aminoácido libre o unido a proteínas (Murch *et al.*, 2004a). Esto produce un reservorio endógeno de neurotoxina en el cuerpo humano (Figura 5) que puede ser liberado de forma lenta y progresiva a otros tejidos durante el catabolismo proteico durante décadas después de la ingestión del L-BMAA (Murch *et al.*, 2004a; Cucchiaroni *et al.*, 2010). Así se puede explicar el largo periodo de latencia desde la exposición a la neurotoxina hasta el desarrollo de los síntomas encontrados entre los Chamorro (Murch *et al.*, 2004a,b; Papapetropoulos, 2007).



**Figura 5.** Reservorio endógeno de L-BMAA. El L-BMAA se une a proteínas y funciona como un reservorio endógeno neurotóxico que libera lentamente la neurotoxina directamente hacia los tejidos cerebrales a través del metabolismo proteico. Figura adaptada de Murch *et al.*, 2004a.

El L-BMAA es un aminoácido excitatorio que principalmente actúa como agonista del glutamato. Para ello, tiene una característica estructural particular, y es que el L-BMAA reacciona con el  $\text{CO}_2$  a pH fisiológico para formar aductos de  $\alpha$ - y  $\beta$ -carbamato. Estos aductos tienen una estructura similar al neurotransmisor glutamato y son agonistas selectivos de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Bienfang *et al.*, 2011).

Son estos aductos de carbamato los que tienen actividad neurotóxica. Es necesario por tanto, la adición de bicarbonato 10 mM en cultivos de células disgregadas, como se describió por primera vez por Weiss y Choi (1988) para poder mimetizar el efecto neurotóxico del aminoácido (Figura 6).



**Figura 6.** Similitud estructural entre el carbamato de L-BMAA y el ácido glutámico. Figura adaptada de Chiu et al., 2011.

El L-BMAA no tiene carga a pH 7,4 así que accede al cerebro por el transportador de aminoácidos neutros (Duncan et al., 1991).

La formación del carbamato de L-BMAA a pH fisiológico permite activar a receptores NMDA, AMPA/kainato o receptores ionotrópicos de glutamato dependiendo del diseño experimental elegido. El carbamato también actúa activando a receptores metabotrópicos de glutamato (Nunn, 2009).

La sobreactivación de receptores metabotrópicos de glutamato, especialmente receptores NMDA, ha sido implicada en la muerte neuronal que ocurre durante enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Cuando se descubrió que el L-BMAA era un agonista de los receptores de glutamato, específicamente de los NMDA, comenzó a ser obvio el mecanismo de acción potencial por el cual el L-BMAA induce neurodegeneración, ya que la activación de estos receptores puede producir muerte neuronal (Lobner, 2009). En contraposición, la toxicidad selectiva del L-BMAA sobre poblaciones neuronales específica es mediada por los receptores de AMPA/kainato. Una pequeña subpoblación neuronal de los cultivos corticales, distinguida por la presencia de NADPH diaforasa, es altamente sensible a la toxicidad del L-BMAA, mediada por estos receptores de AMPA/kainato. Una posible explicación para estos resultados obtenidos es que las motoneuronas, y las neuronas corticales con NADPH-diaforasa, son inusuales porque contienen un elevado número de receptores AMPA/kainato permeables al calcio (Lobner, 2009).

Hay también evidencias que indican que el L-BMAA es un agonista del grupo 1 y 2 de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs). El grupo 1 de receptores induce la hidrólisis del fosfatidilinositol con la formación de inositoltrifosfato (IP3) y la consecuente liberación de calcio del retículo endoplásmico. La activación de estos receptores induce muerte neuronal. El L-BMAA se une con baja afinidad, pero mucha fuerza, a los receptores mGluR1. La baja afinidad suscita cuestiones sobre la relevancia fisiológica de la acción de este receptor, sin embargo, se ha encontrado la activación de mGluR5, otro tipo de receptor del grupo 1, a través del cual el L-BMAA induce muerte

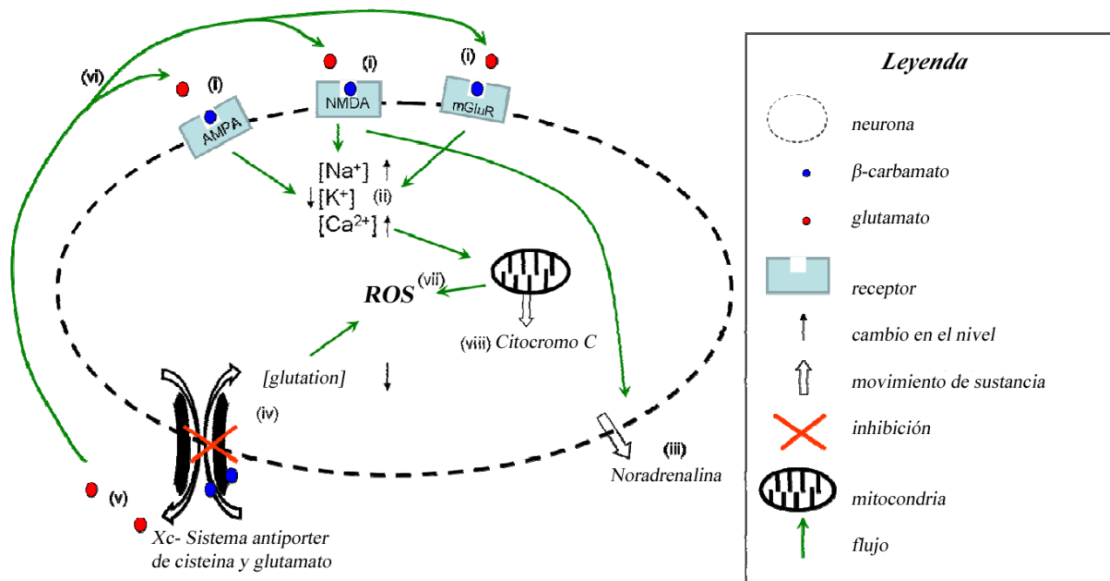
neuronal en cultivos corticales. Los mGluR median liberación de calcio del retículo endoplásmico y puede tener un efecto aditivo con el influjo de calcio a través de receptores de NMDA o de receptores AMPA permeables al calcio. La activación receptores mGluR del grupo 2 causan una disminución de los niveles de AMP cíclico (AMPC) que puede tener un efecto neuroprotector (Lobner, 2009).

Por otro lado, es importante destacar el papel del sistema Xc-. Este sistema implica el transporte de cistina dentro de la célula para ser intercambiada por glutamato que se transporta al medio extracelular. Dadas las funciones del sistema Xc- parece que juega un papel importante en la supervivencia neuronal y en la muerte. Debido a la liberación de glutamato por las neuronas, el glutamato extracelular aumenta y puede causar fenómenos excitotóxicos. A través de la captura de glicina se pueden regular los niveles celulares de glutatión (GSH) y de esta manera determinar si el estrés oxidativo producirá muerte neuronal o no (Liu *et al.*, 2009). Con respecto a este sistema, se sabe que el L-BMAA inhibe la captura de cistina, además aumenta el glutamato en la brecha sináptica, causándose una depleción del glutatión celular, incrementándose así el estrés oxidativo, y los radicales libres mediando la muerte celular en cultivos corticales. La mayoría de la cistina de los cultivos corticales es movilizada mediante el sistema Xc-, y su recaptura es inhibida por el L-BMAA (Lobner, 2009; Liu *et al.*, 2009).

Además, es de gran importancia que el L-BMAA cause una depleción del glutatión celular. Hay evidencias de que este vaciamiento de glutatión juega un papel importante en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson así como en Esclerosis Lateral Amiotrófica (Liu *et al.*, 2009).

Debido a su actuación sobre los receptores previamente mencionados, se sabe que el L-BMAA produce un incremento de la transmisión sináptica excitatoria causada por el glutamato (Figura 7). La excitotoxicidad ocurre cuando el balance entre liberación y recaptura de glutamato en la brecha sináptica es dañado, resultando en un incremento de las concentraciones de glutamato y una excesiva estimulación de sus receptores, lo que conduce a un aumento intracelular del calcio, el daño neuronal y la muerte. Los pacientes con ELA presentan niveles elevados de glutamato. La exposición a especies reactivas de oxígeno (ROS) es suficiente para reducir la captura de glutamato a través de los transportadores de células gliales y neuronales. Además se produce un

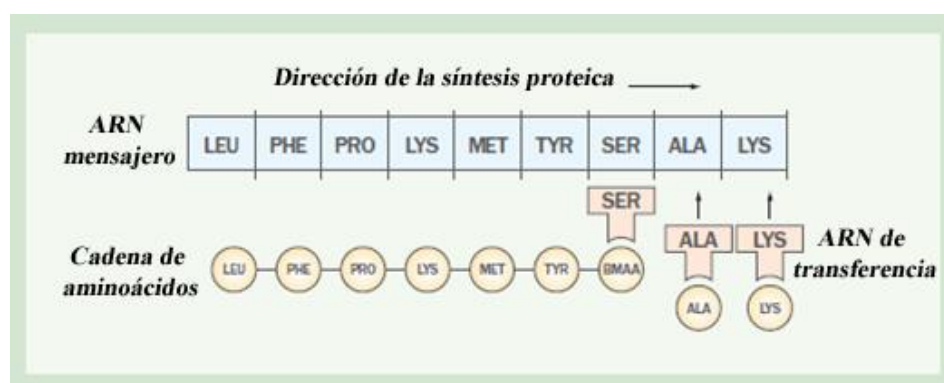
incremento de calcio dentro de las mitocondrias de las neuronas motoras tras el incremento de la generación de ROS. Además la liberación de calcio por los receptores AMPA/kainato al medio extracelular conduce a una oxidación y la disrupción de la captura del glutamato por los astrocitos vecinos a la sinapsis. Así se crea un círculo vicioso de incremento de estrés oxidativo y excitotoxicidad que conduce en último término a la degeneración de la motoneurona (Barber y Shaw, 2010).



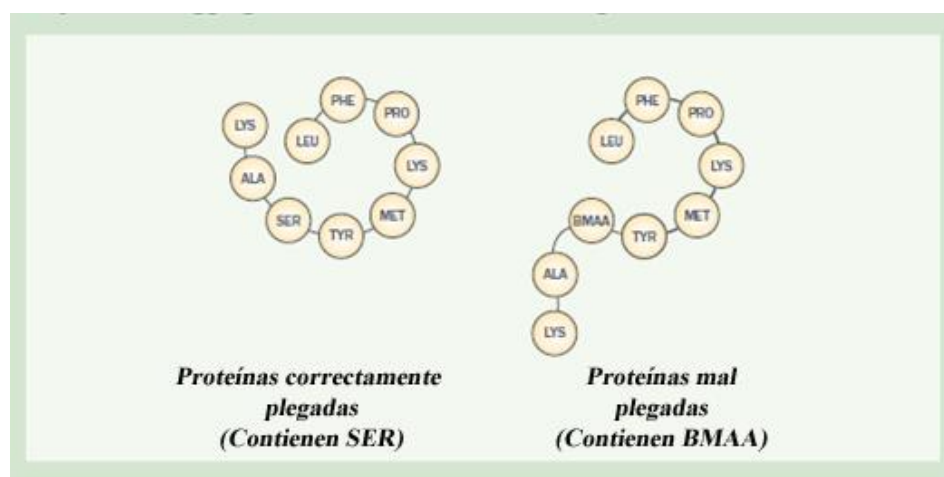
**Figura 7.** Resumen de los mecanismos de acción del L-BMAA en las neuronas. In vivo, el L-BMAA aparece como  $\beta$ -carbamato (representado por puntos azules), que se une a receptores NMDA, AMPA y receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR) (i). La activación de receptores de glutamato resulta en un incremento de los niveles de sodio y calcio en la célula, acompañados de una reducción de potasio (ii). La célula se despolariza y su membrana se vuelve permeable, como se ilustra por la línea punteada, y en combinación con la actividad de los receptores de NMDA, se produce la liberación de noradrenalina desde la célula (iii). El sistema antiporter de cisteína/glutamato  $Xc^-$  es inhibido, indicado con la cruz roja (iv), conllevando a una depleción del glutatión intracelular y un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esta inhibición también causa un incremento de la liberación del glutamato (v), que entonces se unirá a receptores para causar la futura excitotoxicidad (vi). Todos estos mecanismos combinados causan un incremento de la generación de ROS (vii). La elevación del calcio conduce a una sobrecarga de la mitocondria que resulta en una liberación masiva de citocromo-c (cyt-c) al citosol (viii). Figura adaptada de Chiu et al., 2011.

## 1.6. Predisposición genética al daño por L-BMAA

Se sabe que existe una predisposición genética al daño por L-BMAA. Debido al tipo de alteraciones que causa el L-BMAA en el interior de las células, como son un incremento del estrés oxidativo, una disfunción mitocondrial, la alteración de la síntesis y degradación proteica y el desequilibrio de algunas enzimas, se sabe que una codificación genética deficiente para estas enzimas implicadas en el estrés oxidativo así como una deslocalización de las proteínas puede venir condicionada por la dotación genética del individuo. Además, es importante destacar que el L-BMAA va a ser incorporado a proteínas, ya que es reconocido por el ARN de transferencia de la serina, pudiendo conducir a alteraciones en la estructura terciaria de proteínas (Figuras 8 y 9) (Dunlop *et al.*, 2013).



**Figura 8.** El código genético del ARN mensajero contiene la información para la construcción de una proteína, y el ARN de transferencia, que contiene el código de emparejamiento, une el aminoácido correcto. El L-BMAA se une al ARN de transferencia de la serina y entra a formar parte de las proteínas. Figura adaptada de Rodgers y Dunlop (2011).





**Figura 9.** Una vez que el L-BMAA es incorporado a la cadena proteica, la proteína no puede plegarse correctamente. Grupos de proteínas mal plegadas pueden formar agregados que caracterizan las enfermedades neurodegenerativas. Figura adaptada de Rodgers y Dunlop (2011).

Además, las neuronas son extremadamente sensibles a las proteínas mal plegadas, posiblemente porque la toxicidad potencial de contener en el interior celular proteínas mal plegadas no es diluida con la división celular (Dunlop y Rodgers, 2011; Rodgers y Dunlop, 2011; Muñoz-Sáez *et al.*, 2013).

De esta manera, se sabe que el L-BMAA puede influir de manera diferencial sobre unos individuos con respecto a otros aun tratándose de la misma especie.

## **1.7. Alteraciones características de neurodegeneración**

### **1.7.1. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo surge del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de un sistema de eliminar o reparar el daño causado y el restablecimiento de un ambiente reductor. Las ROS celulares surgen como productos del metabolismo aerobio, principalmente debido a un desequilibrio de la cadena respiratoria de transporte de electrones mitocondrial, resultando en una incompleta reducción del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa, para producir un anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Los productos resultantes son agentes altamente oxidantes, capaces de dañar proteínas, lípidos y ADN. Este daño incluye cambios en las conformaciones proteicas, alteraciones en la dinámica de las membranas celulares por oxidación de ácidos grasos insaturados, y alteraciones en ADN y ARN (Barber y Shaw, 2010).

Etiológicamente, el estrés oxidativo parece ser muy importante en una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas cuya aparición sucede en edades avanzadas. De hecho, el envejecimiento es el factor de riesgo más importante común para enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, en las que se

acumula estrés oxidativo que desencadena mutaciones mitocondriales afectando a los niveles oxidativos en las células (Gandhi y Abramov, 2012).

Muchos estudios patológicos revelan la evidencia de un incremento del estrés oxidativo en casos de muestras procedentes de pacientes con ELA (Barber y Shaw, 2010).

### **1.7.2. Disfunción mitocondrial**

La disfunción mitocondrial ha sido extensamente estudiada en las enfermedades neurodegenerativas (Dupuis *et al.*, 2004; Bacman *et al.*, 2006; Hensley *et al.*, 2006; Hervias *et al.*, 2006; Nassif *et al.*, 2010).

La mitocondria es un orgánulo crítico de las células aerobias ya que tiene múltiples funciones. Este orgánulo es el sitio mayoritario de producción de ATP, mantiene la homeostasis del calcio, participando en la señalización mediada por este catión divalente y además regula la vía intrínseca de la apoptosis o muerte celular programada. La estructura, posición y función de la mitocondria son reguladas por la biogénesis mitocondrial, la fusión y la fisión, el transporte y la senescencia. Por ello, una disfunción mitocondrial confiere efectos pleiotrópicos en las células, especialmente en el caso de las neuronas debido a su elevada susceptibilidad al estrés y el envejecimiento. La patología mitocondrial juega un papel clave entre las múltiples hipótesis de trabajo en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas (Shi *et al.*, 2010a, b).

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos y son abundantes en áreas de neuronas activas con intensa demanda de ATP, como en los terminales axónicos, los nodos de Ranvier, y las regiones sinápticas. Para mantener la funcionalidad y la integridad mitocondrial es fundamental que las mitocondrias tengan intacta su morfología así como el potencial de membrana y poder llevar a cabo el transporte axonal, y los procesos de fisión y fusión mitocondrial (Dupuis, 2013).

En pacientes de ELA esporádica y en modelos celulares (Wijersekera y Leigh, 2009) se ha descrito que cuando la SOD está afectada por una mutación, se observa una anormal fragmentación de mitocondrias y el transporte alterado de las mismas hechos que sugieren que la dinámica mitocondrial está alterada. Como se ha mencionado anteriormente la disfunción mitocondrial da lugar a un incremento de estrés oxidativo,

acontecimiento general en la neurodegeneración. En muchas de las enfermedades neurodegenerativas, como son la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la ataxia de Freidrich y la ELA se producen alteraciones en las mitocondrias. El funcionamiento anormal de la cadena de transporte electrónico es además la principal fuente de generación de ROS en estas patologías (Reddy, 2008). Las neuronas son especialmente sensibles a estas alteraciones mitocondriales ya que hacen que su papel sea fundamental para cubrir la elevada demanda energética que requieren. Por ello, en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas se registran anormalidades en el funcionamiento, localización, y estructura de las mitocondrias (Lezi y Swerdlow, 2012).

Las mitocondrias procedentes de pacientes con ELA muestran niveles elevados de calcio y una disminución de la actividad de los complejos I y IV de la cadena respiratoria, resultando en un metabolismo energético defectuoso (Wijersekera y Leigh, 2009). Además, se han encontrado conglomerados densos de mitocondrias en el asta anterior de la médula espinal lumbar en pacientes con ELA esporádica (Shi *et al.*, 2010b).

En mitocondrias de motoneuronas procedentes de pacientes con ELA y en modelos animales de dicha patología se han encontrado también potenciales de membrana mitocondrial alterados (Nassif *et al.*, 2010).

Como se ha mencionado previamente, otra importante función de las mitocondrias es amortiguar la sobrecarga de calcio en las células excitables, como son las motoneuronas. En estas células las mitocondrias juegan un papel clave a corto plazo en el mantenimiento del calcio citosólico en niveles normales. El calcio es un segundo mensajero ubicuo que participa en múltiples vías de señalización celular y que es crucial para la supervivencia. En pacientes de ELA y en modelos de ELA tanto animales como celulares se ha encontrado un incremento de la concentración de calcio celular (Shi *et al.*, 2010a). Además, la elevación local del calcio puede jugar un papel en la regulación del transporte axonal de las mitocondrias, proporcionando un circuito de señalización de la capacidad de tamponamiento del calcio por la mitocondria, la homeostasis del mismo, y la distribución mitocondrial (Shi *et al.*, 2010b; Nassif *et al.*, 2010).

Otra importante función de las mitocondrias es mediar la apoptosis por vía intrínseca de la célula. Se ha visto que esta apoptosis mediada por mitocondrias está implicada en la pérdida de neuronas que caracteriza a la enfermedad de Parkinson, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la ataxia de Friedreich y la ELA (Shi *et al.*, 2010a; Lezi y Swerdlow, 2012). En el modelo transgénico de ratón de SOD1 (G93A) hay una liberación citosólica del citocromo C y los niveles de las proteínas pro-apoptóticas Bad y Bax son incrementados mientras que las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y XIAP se disminuyen. Se ha propuesto que los mutantes de SOD1 pueden secuestrar la proteína anti-apoptótica Bcl-2, reducir el potencial de membrana, y desencadenar la liberación del citocromo c de la mitocondria. Las caspasa-1 y caspasa-3 se han encontrado activadas en motoneuronas y astrocitos de los modelos transgénicos de ratón de SOD1 (G93A, G37R y G85R) (Shi *et al.*, 2010b).

### **1.7.3. Estrés del Retículo Endoplásmico y enfermedades neurodegenerativas**

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular responsable de la síntesis lipídica y proteica. Las proteínas correctamente plegadas que pasan el control de calidad correspondiente, son transportadas a través del RE y del aparato de Golgi, que conforman la vía secretora, para llegar a su destino intracelular. Tras la translocación al lumen del RE por el canal del complejo traslocón, las proteínas en estructura nativa, son asistidas por chaperonas, proteínas plegadoras y cofactores (Nassif *et al.*, 2010). Cuando las proteínas no son correctamente plegadas son transportadas hacia el citosol celular para promover su degradación. Esta degradación de proteínas mal plegadas es llevada a cabo de manera proteasoma dependiente, siendo la maquinaria de degradación asociada al RE (ERAD de las siglas en inglés de *Endoplasmic Reticulum-associated Degradation*) la encargada de llevar el proceso a término, se considera por tanto, que es una salida de emergencia del RE. La maquinaria de degradación asociada al RE consiste en chaperonas, proteínas transmembrana y enzimas asociadas a ubiquitina que seleccionan la proteína diana y retrotranslocan esas proteínas mal plegadas al citoplasma para su degradación por el proteasoma (Vembar y Brodsky, 2008). Alteraciones en este sistema han sido descritas en múltiples desordenes

neurodegenerativos como pueden ser la enfermedad de Huntington, el Parkinson o la ELA (Nishitoh *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2009; Slodzinski *et al.*, 2009)

Existen condiciones celulares que interfieren con la función descrita previamente del RE conduciendo a un plegamiento anormal de proteínas y a la acumulación de dichas proteínas con plegamiento defectuoso en el lumen del RE, esta situación celular se conoce como estrés del RE (Nassif *et al.*, 2010).

El estrés del RE puede ser ocasionado por diversas alteraciones celulares entre las que se incluye una anormal homeostasis del calcio, alteraciones del estado REDOX de la célula, la privación de glucosa o de energía, la expresión de genes mutados, y la demanda de una alta actividad secretora (Nassif *et al.*, 2010). Para aliviar el estrés celular producido por la presencia de proteínas mal plegadas las células desencadenan una vía de transducción de señales denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR de las siglas en inglés de *Unfolded Protein Response*). La activación de UPR tiene diversas consecuencias celulares afectando a la expresión de proteínas implicadas en casi todos los eventos acontecidos durante la vía secretora (Nassif *et al.*, 2010).

Aún se desconoce si el estrés oxidativo es una causa o una consecuencia de la neurodegeneración que se produce con el desarrollo de la patología de la ELA esporádica (Barber y Shaw, 2010). La mayor parte de la investigación que se dedica a abordar la relación entre la vía secretora y la ELA se centra en las anomalías del proceso que sucede en la ELA genética, ya que los modelos animales transgénicos facilitan mucho el estudio (Nassif *et al.*, 2010).

#### **1.7.4. Aparato de Golgi y neurodegeneración**

El aparato de Golgi (AG) está compuesto de una serie de cisternas aplanadas, paralelas e interconectadas que se disponen alrededor del centro organizador de los microtúbulos en la región perinuclear de las células. El AG es una estructura altamente dinámica que juega un papel clave en el transporte, procesamiento y direccionamiento de proteínas a su destino final, incluyendo la membrana plasmática, el RE, y los lisosomas (Farquhar, 1985; Nassif *et al.*, 2010). Además, en las neuronas el AG está implicado en el flujo axoplásmico de numerosas proteínas y de macromoléculas exógenas. Por ello las

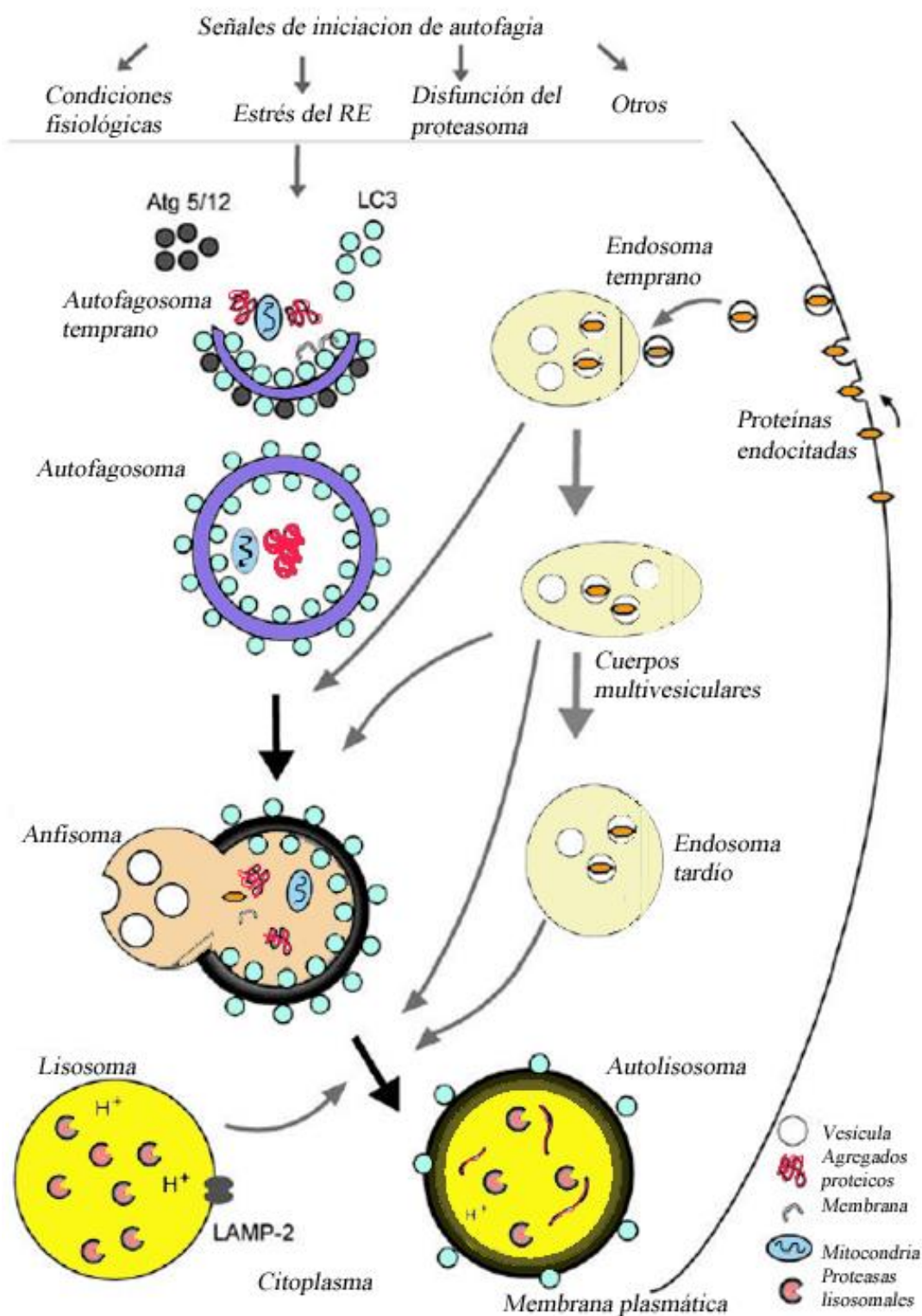
alteraciones en el AG pueden tener consecuencias nefastas para la función presináptica (Fujita *et al.*, 2008).

Las alteraciones en el AG o la inhibición del tráfico entre RE y AG conducen a estrés del RE. La fragmentación del AG y su dispersión precede a la muerte neuronal inducida por excitotoxinas, daños oxidativos y nitrosativos, y estrés del RE entre otros estímulos de muerte celular (Nakagomi *et al.*, 2008). Durante los procesos apoptóticos el AG se desensambla en conjuntos tubulovesiculares (Mukherjee *et al.*, 2007). Se ha visto que hay proteínas del AG que participan en la escisión de algunas caspasas, proceso necesario para su activación, pudiendo tener un papel muy importante en la regulación fina de respuestas al estrés, y de la señalización de muerte celular para la ejecución del desensamblaje de orgánulos durante la apoptosis (Nassif *et al.*, 2010).

#### **1.7.5. Autofagia**

Un punto clave de las patologías que implican neurodegeneración es la agregación anormal de proteínas y la pérdida de neuronas. En las células eucariotas hay dos formas clave para eliminar las proteínas citoplásmicas excedentes, que son, el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía autofagosoma-lisosoma. Muchos autores creen que, de manera indirecta, la activación de la autofagia puede ser un mecanismo neuroprotector en algunas enfermedades neurodegenerativas ya que promueve la degradación de agregados proteicos tóxicos (Nassif y Hetz, 2011; Ghavami *et al.*, 2014). En este sentido, también se sabe que la desregulación de la autofagia contribuye a la neurodegeneración, ya que las alteraciones durante este proceso pueden conducir a un incremento del contenido del autofagosoma y a una eliminación incompleta de la carga, derivando en una acumulación de proteínas y orgánulos celulares dañados. Además, las vacuolas autofágicas se forman en paralelo con la degradación de proteínas. Bajo condiciones patológicas, la tasa de formación de vacuolas autofágicas puede superar a la tasa de degradación, denominándose este estado celular “estrés autofágico”. En este proceso ocurre un desequilibrio entre la inducción y el aclaramiento de los autofagosomas que pueden desarrollar colectivamente este fenómeno (Cherra y Chu, 2008; Ghavami *et al.*, 2014).

El proceso de autofagia (Figura 10), comienza con la formación del fagóforo, o membrana de aislamiento, que se expande para encapsular porciones de citoplasma que contienen las proteínas y orgánulos a degradar en el autofagosoma. La cadena ligera 3-II asociada a microtúbulos (LC3-II) es la proteína mayoritaria que marca la autofagia en eucariotas ya que está directamente asociada con el autofagosoma (Kabeya *et al.*, 2000; Nassif *et al.*, 2010). Los autofagosomas son transportados a lo largo de los microtúbulos de manera dineína dependiente siendo conducidos hacia los lisosomas. Los lisosomas maduran mediante fusión con vesículas endosomales o cuerpos multivesiculares (de las siglas en inglés MVBs, anfisomas), y los fusionan con lisosomas para formar el autolisosoma. Para terminar, los contenidos citoplásmicos son degradados por las hidrolasas ácidas lisosomales. Debido a su morfología los autofagosomas, los anfisomas y los autolisosomas forman un continuo denominado vacuolización autofágica (Chen *et al.*, 2012).



**Figura 10.** Proceso autofágico. Una gran variedad de señales fisiológicas y nocivas (por ejemplo, privación de nutrientes, proteínas mal plegadas y daños a orgánulos celulares) inducen autofagia. Los procesos autofágicos comienzan con la nucleación de un complejo



*proteico para formar la creciente membrana del fagóforo. Entonces, las vesículas se expanden y encapsulan materiales secuestrados incluyendo citosol, orgánulos, y agregados de proteínas, formando una vesícula de doble membrana, el autofagosoma. Los autofagosomas se fusionan con compartimentos endocíticos que incluyen endosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas. Los anfisomas son orgánulos que contienen ambos, los autofagosomas y los constituyentes endosomales. Los anfisomas y los autofagosomas maduran mediante la fusión con lisosomas formando el autolisosoma en el que encapsulan el contenido celular que es degradado por enzimas hidrolíticas y proteasas. Figura adaptada de Nassif et al., 2010.*

Es interesante determinar si en los procesos neurodegenerativos la autofagia juega un papel positivo o negativo para la supervivencia neuronal (Ghavami *et al.*, 2014). Zhang *et al.* (2011) describieron alteraciones en la vía de autofagia en el modelo de ratón mutante para superóxido dismutasa viendo que existía una neurodegeneración selectiva de las motoneuronas y demostraron que la activación de la vía apoptótica aceleraba el curso de la enfermedad y el proceso neuropatológico (Zhang *et al.*, 2011). Aun así, se necesita profundizar más en los estudios relacionados con los fenómenos autofágicos para precisar el papel que juega este complejo proceso en la neurodegeneración.

### **1.8. Afectación del cerebelo causada por el L-BMAA**

El cerebelo es una región del encéfalo cuya función principal es integrar las vías sensitivas y motoras, integra toda la información recibida para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral envía al aparato locomotor a través de las vías motoras. Por tanto, el cerebelo es un centro motor subcortical muy importante que asegura que los movimientos sean realizados con precisión espacial y temporal (Ito, 1984). Las lesiones cerebelares no suelen causar parálisis pero sí desordenes relacionados con la ejecución de movimientos precisos, mantenimiento del equilibrio, la postura y el aprendizaje motor. Sería interesante considerar que el L-BMAA afecta al cerebelo de las ratas de igual manera que afecta a otras zonas de Sistema Nervioso Central (SNC) como son la corteza motora primaria y la médula espinal (de Munck *et al.*, 2013b). Para determinar los tejidos diana del L-BMAA dentro del SNC Karlsson *et al.* (2009), marcaron el L-BMAA radiactivamente y posteriormente lo inyectaron a ratones realizando un seguimiento de la distribución del toxico a medida que avanzaba el tiempo transcurrido desde la inyección. A las 24 horas, se detectó radiactividad en

tálamo, cerebelo, tronco cerebral, medula espinal, así como en estriado e hipocampo. Esta distribución se cree que es debida a la afinidad del L-BMAA por los receptores de glutamato presentes en dichas áreas. Además todas las áreas en las que se encontró L-BMAA se corresponden con zonas implicadas en el control motor y el equilibrio (Lalonde y Strazielle, 2007).

Hay muchos niveles de vulnerabilidad selectiva en neuronas expuestas al L-BMAA. Para comenzar, las neuronas sensoriales y autónomas así como las neuronas cerebelares son casi siempre preservadas o afectadas por un grado subclínico leve, y en cambio las neuronas motoras y frontotemporales son las que aparecen afectadas en niveles más graves y con una mayor variabilidad (Robberecht y Philips, 2013).

En la corteza cerebelosa se pueden distinguir la capa de células granulares, la capa de células de Purkinje y la capa molecular. La capa granular es la capa más profunda y de mayor espesor de la corteza cerebelosa limitando con la sustancia blanca. En ella se encuentran las células granulares que son unas neuronas de aspecto linfocitoide. La capa de células de Purkinje está constituida por los somas de este tipo neuronal que conforma una lámina monocelular. Son el tipo neuronal más grande que encontramos en el cerebelo, y poseen un árbol dendrítico muy denso que es característico de este tipo neuronal. Ultraestructuralmente, las células de Purkinje se caracterizan porque su soma presenta un RE rugoso abundante y un AG muy desarrollado. Frecuentemente aparecen cisternas de RE liso justo debajo de la membrana plasmática denominadas cisternas hipolemmales que son características de este tipo celular. Y por último, se dispone la capa molecular, que es la más superficial, y que contiene principalmente prolongaciones celulares y casi ningún soma (Ito, 1984, 1987, 1990).

Ya en 1990, Seawright *et al.* (1990) confirmaron que el L-BMAA producía daño tóxico en ciertas neuronas cerebelares, y dicho daño era selectivo, alterando morfológicamente los distintos tipos neuronales, como son las células de Purkinje o alteraciones descritas en la capa granular y molecular (Seawright *et al.*, 1990). En todos los casos, tanto con una dosis aguda de L-BMAA inyectada intraperitonealmente en ratas como con dosis más bajas y continuadas en el tiempo se obtuvo una pérdida celular en el cerebelo de los animales tratados (Seawright *et al.*, 1990).

Se han realizado experimentos para determinar la afectación de las células granulares del cerebelo, que constituyen la capa más profunda del mismo, por el L-BMAA (Staton y Bristow, 1998). En este trabajo, se demuestra que el L-BMAA 3 mM produce un 35% de muerte en cultivos primarios de células granulares del cerebelo. Además, estos autores y en estas mismas células han visto que el L-BMAA, actuando a través de los receptores metabotrópicos, induce muerte durante las 12-72 horas por mecanismos que implican tanto la vía necrótica como la muerte celular por apoptosis (Staton y Bristow, 1997).

### **1.9. Biomarcadores de neurodegeneración**

Los biomarcadores se pueden utilizar para diversos fines, dependiendo del objetivo del estudio. Su uso puede tener como objetivo dilucidar la relación causa-efecto y dosis-efecto sobre la evaluación del riesgo para la salud. La complejidad de las funciones del sistema nervioso, la naturaleza de múltiples eventos neurotóxicos y la variabilidad celular, son factores que limitan el análisis de posibles biomarcadores.

En pacientes diagnosticados con ELA se han encontrado motoneuronas con inclusiones ubiquitinizadas, y mitocondrias anormales. También se ha descrito que poseen agregados de neurofilamentos y se ha demostrado una activación glial (Barber y Shaw, 2010). Entre los mecanismos de neurodegeneración de la ELA también están presentes el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, el estrés del retículo endoplásmico, los agregados proteicos, la disrupción del entramado de neurofilamentos y el tráfico intracelular a través de microtúbulos y defectos del procesamiento del ARN. La degeneración además conduce a la muerte neuronal a través de la muerte celular programada dependiente de caspasas (Barber y Shaw, 2010).

Estudios recientes han demostrado que la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK3) y que la proteína TAR43 de unión al ADN (TDP-43) juegan un papel importante en las enfermedades neurodegenerativas y por lo tanto pueden ser considerados candidatos para biomarcadores de ELA (de Munck *et al.*, 2013b).

### 1.9.1. GSK3

GSK3 es una serina-treonina quinasa que fue identificada originalmente por estar involucrada en el metabolismo de la glucosa. Como su propio nombre indica, media la unión de moléculas de fosfato a proteínas en residuos aminoacídicos de serina y treonina. (Embi, 1980; Woodgett y Cohen, 1984). GSK3 fue purificada y aislada de músculo esquelético (Cohen *et al.*, 1982; Woodgett, 1990) y clonada por primera vez en 1990. En eucariotas existe en dos isoformas, la isoforma  $\alpha$  y la  $\beta$ , que son codificadas por genes independientes. Estos genes codifican para dos proteínas con pesos moleculares de 51 y 47 KDa respectivamente. Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  comparten un total de identidad de secuencia del 85%, pero si nos referimos a su dominio catalítico son significativamente más parecidas, mostrando una identidad de secuencia del 93% (Figura 11). Existe una variación de *splicing* de la isoforma  $\beta$  que ha sido aislada a partir de cerebros de ratón, rata y humanos. Esta variación tiene 13 aminoácidos insertados en el dominio C-terminal de la proteína. La naturaleza, el efecto de esta inserción en la proteína, y si afecta a la función aún se desconoce (Wagman *et al.*, 2004; Hur y Zhou, 2010).

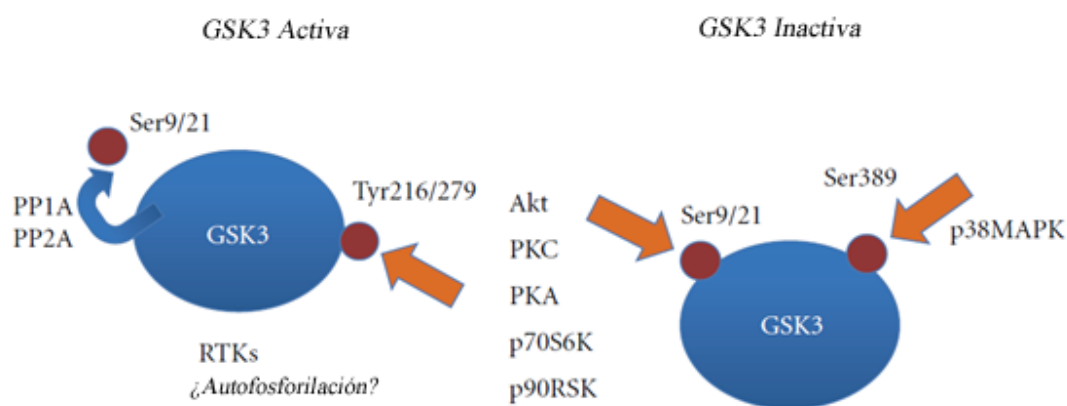
Poco se sabe acerca de los dominios de unión de GSK3, sin embargo, tenemos un corto dominio N-terminal, un dominio C-terminal y el dominio quinasa (Eom y Jope, 2009).



**Figura 11.** Representación esquemática de GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ . Los triángulos rojos señalan los sitios de fosforilación en tirosina requeridos para la máxima actividad catalítica y los azules indican los sitios de la fosforilación inhibitoria. Figura adaptada de Bradley *et al.*, 2012.

GSK3 es una quinasa un tanto inusual en el genoma humano por tres razones principales: (1) La mayoría, si no todos los sustratos requieren la fosforilación previa por parte de otra quinasa, antes de ser eficientemente fosforilada en residuos de

Serina/treonina por GSK3. (2) GSK3 se encuentra altamente activada en células en condiciones basales. (3) La fosforilación de GSK3 en un residuo N-terminal inhibe la actividad quinasa (Ser21 en GSK3 $\alpha$ , Ser9 en GSK3 $\beta$ ). Esta fosfoserina actúa como un pseudosustrato uniéndose al bolsillo del sitio de unión de fosfato de GSK3, previniendo su interacción con sustratos previamente fosforilados (Figura 12). (Salcedo-Tello *et al.*, 2011; Cole, 2012).



**Figura 12.** Modulación de la actividad de GSK3 por fosforilación. Las proteínas fosfatasa 1 y 2A activan GSK3 eliminando la fosforilación de Ser9/21. También se sabe que la activación de GSK3 puede producirse por fosforilación en residuos de tirosina por miembros de la familia del receptor de tirosina quinasa de los receptores de la superficie celular (RTKs de las siglas en inglés de receptor tyrosine kinase) o por autofosforilación. Por otro lado, las redes de señalización activan múltiples proteínas quinasa, que pueden llevar a cabo la fosforilación en diferentes residuos y por tanto la inhibición de GSK3. Figura adaptada de Salcedo-Tello *et al.*, 2011.

GSK3 se ha visto implicada en múltiples rutas de señalización celular (Cole, 2012). GSK3 fosforila a más de 100 sustratos y regula múltiples vías de señalización, como son Sonic Hedgehog, Notch y la señalización mediada por factores de crecimiento a través de Akt, que influye en la supervivencia celular en el cerebro (Valvezan y Klein, 2012). Entre los sustratos descritos para GSK3 destacan los factores de transcripción, como la proteína de unión de elementos de respuesta a AMPc (CREB), el factor nuclear de las células T activadas (NFAT), neurogenina, Smad1, c-Jun, y  $\beta$ -catenina. Las variaciones en los niveles y en la actividad de GSK3 pueden ser un mecanismo de control sobre estos factores de transcripción, sobre sus actividades de unión al ADN, y

sobre su localización nuclear. Además, se ha visto que GSK3 regula la activación de muchas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) y como consecuencia controla la reorganización durante la división celular, coordina los movimientos de migración neuronal y guía el crecimiento axónico (Hur y Zhou, 2010).

Recientemente se ha descrito también que GSK3 controla la plasticidad sináptica pudiéndose ver implicada en procesos de memoria y aprendizaje como son la depresión y en la potenciación a largo plazo (LTD y LTP) (Salcedo-Tello *et al.*, 2011; Bradley, 2012).

GSK3 juega un papel crucial en el control de la proliferación celular y el establecimiento de la polaridad neuronal durante el desarrollo neuronal (Liu *et al.*, 2012). La modulación de GSK3 en áreas del cerebro que ayudan a las funciones cognitivas se ha convertido en un foco importante para el tratamiento de enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). Como consecuencia cambios en la expresión, localización subcelular y síntesis de GSK3 han sido asociados con muchos desordenes neurodegenerativos.

El mantenimiento de niveles apropiados de actividad de GSK3 es crucial, ya que tanto altos como bajos niveles pueden promover la muerte celular en ciertas condiciones. El aumento de la actividad de GSK3 reduce el umbral para la activación de la vía apoptótica intrínseca, la inhibición farmacológica de GSK3, así, aumenta el umbral para las señales que activan este mecanismo de muerte celular programada. Esta reducción del umbral apoptótico por GSK3 está mediada por la regulación de GSK3 de las proteínas implicadas en causar trastornos mitocondriales y los niveles de expresión de proteínas reguladoras apoptóticas. Sin embargo, la sobreexpresión de los niveles suprafisiológicos de GSK3 es suficiente para permitir que la apoptosis prosiga aún en ausencia de una señal apoptótica adicional. En contraposición con estas condiciones, GSK3 aumenta el umbral para la señalización apoptótica extrínseca mediante la represión de la iniciación de la muerte mediada por el receptor de activación aguas arriba de la caspasa-8, un evento temprano en esta vía, por lo que los inhibidores de GSK3 facilitan la señalización por la vía apoptótica extrínseca. Así, estudios sobre el papel de GSK3 como un sensor celular que integra estímulos que activan la apoptosis han revelado sus funciones duales para promover tanto la vía intrínseca, como para

inhibir la señalización extrínseca, del proceso apoptótico. El conocimiento de tales mecanismos tiene implicaciones importantes, sobre todo en las aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de GSK3 en condiciones asociadas con la señalización de apoptosis intrínseca o extrínseca (Beurel y Jope, 2006).

La actividad de GSK3 también depende de su localización celular. GSK3 se expresa en muchos tejidos pero es particularmente abundante en el sistema nervioso (Woodgett, 1990; Leroy y Brion, 1999). Así se observa que una inhibición prolongada de GSK3 está asociada con un elevado crecimiento celular, mientras que la activación se asocia con la neurodegeneración (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

En cuanto a su localización subcelular, a pesar de que está predominantemente localizada en el citosol, también está presente en el núcleo (Bijur y Jope, 2001) y en las mitocondrias, donde es muy activa en comparación con su actividad citosólica (Vuk y James, 1994; Van Wauwe y Haefner, 2003; Salcedo-Tello *et al.*, 2011). Esta distribución subcelular de GSK3 es regulada por la secuencia de localización nuclear (NLS), por la cola N-terminal de GSK3, y por los complejos proteicos citosólicos que son capaces de bloquear la función de la secuencia NLS secuestrando a GSK3 en el citosol (Meares y Jope, 2007).

La importancia de GSK3 en las funciones cerebrales ha sido establecida por varios estudios en ratones transgénicos, que muestran diferentes defectos neurológicos dependiendo de la forma en la que GSK3 esté implicada. Aunque la eliminación de GSK3 puede llegar a ser letal, los animales exhiben una mayor ansiedad y unos niveles exploratorios reducidos. Por otra parte, la eliminación de GSK3 $\alpha$  se refleja en una reducción de la ansiedad, la agresividad y la actividad motora (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

En el cerebro, GSK3 regula los procesos de desarrollo, incluyendo la neurogénesis, migración, crecimiento, guía de axones y la plasticidad sináptica (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). La insulina, las neurotrofinas y los factores de crecimiento activan a PI3K y Akt que fosforilan a GSK3 en un residuo de serina N-terminal, lo que crea un pseudosustrato que inhibe a GSK3 permitiendo la activación de efectos más tardíos en

la cascada de señalización como la fosforilación de glucógeno sintasa y la diana de mamíferos para rapamicina, mTOR (Valvezan y Klein, 2012).

Como un objetivo crucial en la mediación de una variedad de procesos neuronales, GSK3 se propone como una diana terapéutica para la restauración de la función sináptica, particularmente en la enfermedad de Alzheimer (Jope y Johnson, 2004; Salcedo-Tello *et al.*, 2011; Cole, 2012). Así, inhibidores de GSK3 representan una promesa como agentes modificadores de la neurodegeneración del Alzheimer (Martínez *et al.*, 2011). También ha sido encontrada una estrecha relación entre la enfermedad de Parkinson y la actividad y localización subcelular de GSK3 (Gong *et al.*, 2012). La expresión de GSK3 $\beta$  aparece regulada al alza en ELA y se encuentra asociada con deposiciones intraneuronales de proteína tau hiperfosforilada. Esto sostiene el potencial papel de GSK3 $\beta$  como diana terapéutica para los pacientes de ELA (Yang W. *et al.*, 2008).

### 1.9.2. TDP-43

La presencia de agregados proteicos en el citoplasma de neuronas es una característica típica de la mayoría de enfermedades neurodegenerativas. En muchos de estos desórdenes aparecen proteínas específicas de la patología, como tau formando neurofibrillas en la enfermedad de Alzheimer o  $\alpha$ -sinucleína en cuerpos de Lewy característicos de la enfermedad de Parkinson (Mackenzie *et al.*, 2010). La composición bioquímica de las inclusiones marcadas con ubiquitina presentes en Esclerosis Lateral Amiotrófica se ha identificado con una alteración de la proteína de unión al ADN TAR-43 (TDP-43) (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2006; Pesiridis *et al.*, 2009).

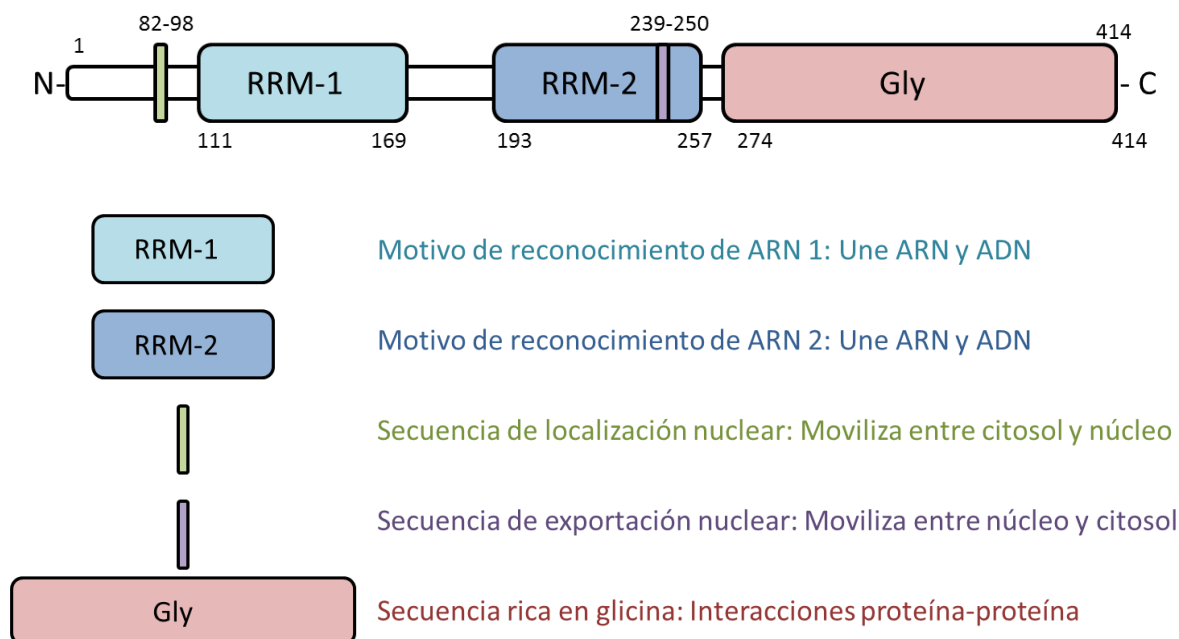
TDP-43 es una proteína de 43 KDa y 414 aminoácidos codificados por el *splicing* alternativo del ARNm procedente del gen TARDBP presente en humanos en el cromosoma 1p36,22, con cinco exones y un intrón (Figura 13). Esta proteína está altamente conservada y muy distribuida entre los distintos tipos celulares localizándose de manera preferente en la fracción nuclear (Wang *et al.*, 2004; Pesiridis *et al.*, 2009; Mackenzie *et al.*, 2010).

Globalmente, hay unas 70 mutaciones puntuales distintas de TARDBP identificadas hasta la fecha. La mayoría de estas mutaciones ocurren en el exón 6 de TARDBP que



codifica para aproximadamente el 60% de la proteína de TDP-43 y más del 70% del transcrito de ARN mensajero (ARNm). A la vista de estas observaciones está claro que el exón 6, y la región codificada rica en glicina es un dominio crítico de la proteína TDP-43 (aminoácidos 275-310). La función fundamental de este motivo está afectada por las mutaciones que son patológicas en ELA (Pesiridis *et al.*, 2009). Las proteínas de unión al ARN mensajero facilitan el movimiento del ARNm desde el núcleo al citosol como parte de la maquinaria biológica que regula el metabolismo del ARNm, la degradación del ARNm y la traducción de proteínas (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010).

Con respecto a su estructura, cabe destacar que contiene dos motivos de reconocimiento de ARN y una región C-terminal rica en glicina que le permite unirse a la hebra sencilla de ADN, al ARN y a otras proteínas (Mackenzie *et al.*, 2010). TDP-43 contiene regiones de localización y exportación nuclear, lo cual le permite moverse libremente en el interior celular entre el citosol y el núcleo. Se ha visto, además, que en los casos de neuropatologías, TDP-43 a pesar de ser predominantemente nuclear aparece en el citosol formando agregados que presumiblemente contienen modificaciones post-transcripcionales (Tsuji *et al.*, 2012). Además, se sabe que la presencia de fragmentos C-terminales de TDP-43, de menor peso molecular que la proteína completa, es una característica que afecta a los tejidos neuronales en ELA. Ayala *et al.* (2008) describieron que la disrupción de la capacidad de unión a ácidos nucleicos de TDP-43 o la eliminación de la cola C-terminal interfiere en la correcta distribución intracelular de la proteína (Tsuji *et al.*, 2012). La formación de las inclusiones de TDP-43 en el citosol aparece acompañada por la disminución de la cantidad de TDP-43 nuclear. Se han descrito también inclusiones de TDP-43 fosforilado en neuronas distróficas y en inclusiones citoplásmicas e intranucleares (Neumann *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Además, dado que la agregación de esta proteína y los fragmentos C-terminales son formas aberrantes de TDP-43, en muchas ocasiones las inclusiones encontradas poseen un marcaje con ubiquitina (Neumann *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2010). Además la sobreexpresión de TDP-43 *in vivo* conduce a efectos tóxicos que originan daños motores progresivos (Stallings *et al.*, 2010). Alterando la actividad del proteasoma, se ha visto que se induce la acumulación y agregación citoplásmica de TDP-43 en neuronas primarias del hipocampo y neuronas corticales, así como en una línea celular de neuronas motoras immortalizadas (línea NSC-34) (Van Eersel *et al.*, 2011).



**Figura 13.** Regiones estructurales de TDP-43. TDP-43 tiene cinco regiones funcionales incluyendo dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM1 y RRM2), una región de localización nuclear y una señal de exportación nuclear que media el transporte nucleocitoplásmico, y una región rica en glicina que media las interacciones proteína-proteína y que puede ser la implicada en la formación de agregados anómalos de TDP-43.

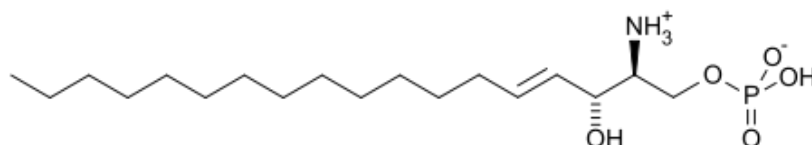
Existen diversos modelos de animales transgénicos para TARDBP, los cuales se han creado para intentar descifrar las dianas afectadas en la patología y poder estudiar los mecanismos fisiopatológicos y el papel de TDP-43 en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Xu *et al.*, 2010, Tsai *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2010). En estos modelos, se demuestra que cambios en la homeostasis de TDP-43 en la célula, pueden desencadenar fenómenos neurotóxicos que dificultan la funcionalidad motora normal de los animales. La acumulación de TDP-43 en gránulos de estrés (Dewey *et al.*, 2012), la denervación, astrogliosis, las inclusiones citoplásmicas ubiquitinizadas, las alteraciones subcelulares de TDP-43, así como la fragmentación proteica son características de enfermedades humanas relacionadas con las proteinopatías de TDP-43 (Stallings *et al.*, 2010). Estas alteraciones moleculares, celulares y comportamentales coinciden con las registradas en el caso de enfermedades neurodegenerativas como la demencia frontotemporal lateral o la ELA (Tsai *et al.*, 2010).

Además hay estudios en los que se valora la aparición de inclusiones de TDP-43 y si están ubiquitinizadas o no, tal y como ocurre en algunos casos de demencia frontotemporal. Los niveles alterados de proteínas como TDP43 en cerebelo engloban a este área del sistema nervioso central como uno de las afectadas por las proteinopatías de TDP-43 (Geser *et al.*, 2008; King *et al.*, 2011; Josephs *et al.*, 2013). Por eso los modelos animales con alteraciones en esta proteína suponen una gran utilidad como modelo animal de la enfermedad de ELA (Stallings *et al.*, 2010; de Munck *et al.*, 2013b).

## 1.10. Neuroprotectores

### 1.10.1. Esfingosina 1 fosfato

La S1P es un esfingolípido. Gracias a su estructura simple de una única cadena y a su grupo fosfato, es uno de los esfingolípidos más solubles, lo que permite que pueda moverse fácilmente dentro de las membranas (Figura 14).



**Figura 14.** Estructura de la S1P.

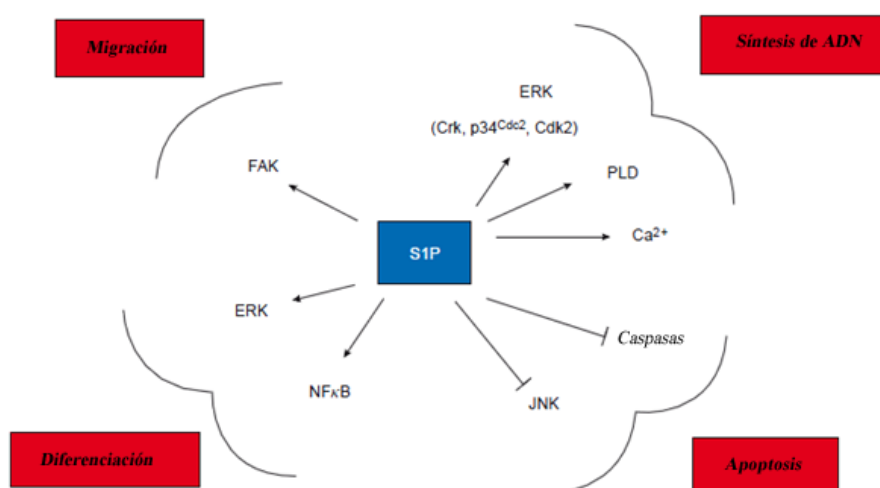
En condiciones normales, en las células se encuentra en baja concentración, del orden de nanomolar, lo que permite que modificaciones en su concentración sirvan de señalización para activar distintos procesos.

Originalmente se pensó que era un mensajero intracelular secundario, pero en 1998 se descubrió que era un ligando extracelular para receptores acoplados a proteínas G (S1PR1). Estos receptores están acoplados a proteínas G específicas para cada receptor de los tipos  $G_i$ ,  $G_q$  y  $G_{12/13}$ , siendo las  $G_i$  las más comunes y cuya acción se inhibe con la toxina pertussis (PTX). Ahora se conoce que los receptores de S1P forman parte de la familia de receptores de lisofosfolípidos. Hasta ahora solo se han identificado 5 tipos. Estos receptores se expresan de forma diferencial en función del tejido. S1PR1, S1PR2

y S1PR3 se expresan ubicuamente, S1PR4 es específico de tejidos linfoides y S1PR5 se expresa en la piel y el cerebro (Gräler *et al.*, 1998; Glickman *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 2001).

Esta expresión diferencial es crucial para el desarrollo de sus funciones biológicas activando vías intracelulares mediadas por proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) o PKC.

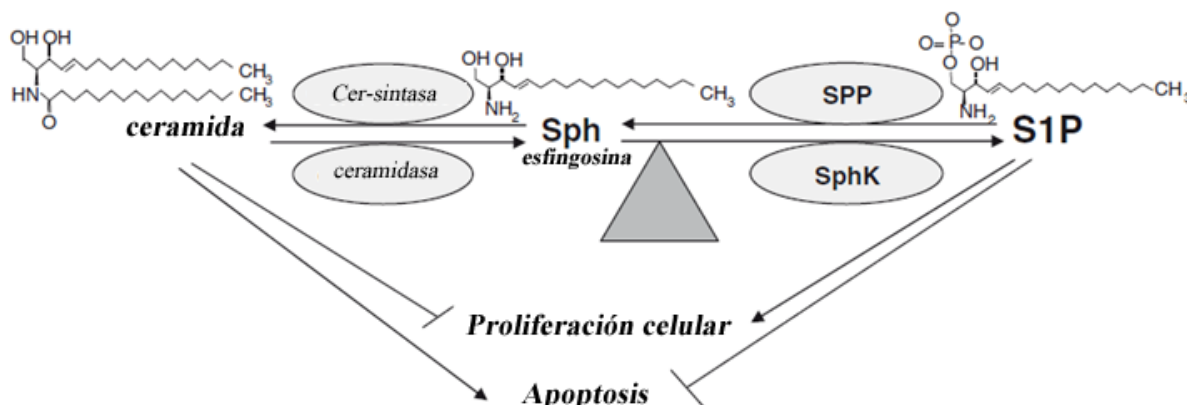
La S1P por tanto, es un lípido bioactivo, que tiene funciones fisiológicas y patofisiológicas (Figura 15). Regula procesos celulares como la proliferación, la migración, la supervivencia y la diferenciación que afectan a todos los sistemas del organismo. Este esfingolípido no solo activa sus receptores específicos para iniciar cascadas de señalización celular sino que además regula dianas proteicas intracelulares específicas. (Pyne y Pyne, 2011).



**Figura 15.** Acciones intracelulares de la S1P Diagrama mostrando las posibles acciones intracelulares de la S1P que afectan a la síntesis del ADN, la apoptosis, la diferenciación y la migración celular. Figura adaptada de Pyne y Pyne, 2000.

La mayoría de los trabajos con esfingolípidos en respuestas al estrés se ha centrado en las funciones de señalización de dos esfingolípidos, la ceramida y la esfingosina-1-fosfato. Numerosos estudios en invertebrados muestran que los niveles de ceramida son incrementados por una gran variedad de estresantes celulares, y cuando estos niveles son aumentados, la célula puede iniciar la apoptosis o la muerte celular programada

(Hannun y Obeid, 2008), mientras que el incremento de la concentración de S1P generalmente promueve la supervivencia celular y la proliferación (Hait *et al.*, 2006; Hannun y Obeid, 2008). Por ello, el balance del nivel celular de estos dos lípidos interconvertibles, que es llamado el reostato esfingolípido (Figura 16), es un importante mecanismo a través del cual se controla el destino celular (Cuvillier *et al.*, 1996; Hait *et al.*, 2006; Van Brocklyn y Williams, 2012).



**Figura 16.** Diagrama de representación del reostato esfingolípido. Figura adaptada de Van Brocklyn y Williams, 2012.

El papel protector de la S1P ha sido investigado en múltiples estudios, como por ejemplo el desarrollado para la protección contra el daño inducido por radiación que ocasiona fallos ováricos e infertilidad (Morita *et al.*, 2000), así como el que estudia su papel protector del daño producido en ovario por la quimioterapia (Hancke *et al.*, 2007). La S1P ha sido establecida como un lípido bioactivo que actúa previniendo la apoptosis endotelial y la necrosis en el síndrome gastrointestinal agudo inducido por radiación (Bonnaud *et al.*, 2010).

La síntesis de análogos de esfingolípidos se ha usado ampliamente para la terapia contra enfermedades en las que el almacenamiento de los esfingolípidos está alterada como es la enfermedad de Niemann-Pick (acumulan esfingomielina) o la enfermedad de Gaucher (en la que se acumula glucosilceramida). Los análogos sintéticos pueden ser usados como drogas anticancerígenas para el tratamiento de las enfermedades con el almacenamiento de esfingolípidos alterado (Gatt y Degan, 2012). También se han realizado importantes avances sobre el uso de los esfingolípidos en el tratamiento de

enfermedades autoinmunes como es la esclerosis múltiple (Podbielska *et al.*, 2012). El papel de la S1P ha sido fundamental para el desarrollo de la vasculatura y la angiogénesis (Takuwa *et al.*, 2010) que podría ser importante para prevenir el desarrollo de tumores y otras enfermedades.

Estudios previos de nuestro laboratorio, establecen una relación entre la S1P y su efecto neuroprotector en un modelo *in vitro* de isquemia generado manteniendo células SH-SY5Y de neuroblastoma humano bajo deprivación de oxígeno y glucosa (Agudo-López *et al.*, 2010b).

Por ello, es importante desde el punto de vista fisiopatológico, ya que podría tener una aplicación directa en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas.

### **1.10.2. Taurina**

La taurina desempeña múltiples funciones celulares incluyendo su papel central como neurotransmisor, como factor trófico en el desarrollo del sistema nervioso central, en el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana, en la regulación del transporte de calcio y la homeostasis, como osmolito, como neuromodulador y como neuroprotector.

La taurina ejerce su función como neuroprotector luchando contra la excitotoxicidad inducida por el glutamato reduciendo el incremento de calcio intracelular inducido por glutamato, variando el ratio Bcl-2/Bad a favor de la supervivencia celular y reduciendo el estrés del RE (Wu y Prentice, 2010). La taurina impide la activación por calcio y la consecuente heterodimerización de Bcl-2 y Bax que conduciría a una cascada apoptótica (Wu y Prentice, 2010).

Por tanto y a modo de resumen podemos decir que la taurina ejerce su efecto neuroprotector mediante: 1) disminución de la elevación del calcio inducida por el glutamato porque inhibe el influjo de calcio desde varios canales incluyendo el transportador de sodio/calcio, canales de calcio regulados por voltaje como son los tipo L, N, y P/Q, y los receptores NMDA de glutamato. 2) inhibición de la fosforilación de los canales de calcio regulados por voltaje resultando en una disminución del flujo de calcio. 3) disminución de la liberación de calcio de los almacenes celulares internos

presumiblemente debido a la inhibición de la fosfolipasa C. 4) inhibición de la activación inducida por glutamato de la calpaina y la consecuente heterodimerización de Bcl-2 y Bax resultando en una inhibición de la liberación del citocromo C por parte de las mitocondrias inhibiéndose la cascada apoptótica (Wu y Prentice, 2010).

### **1.10.3. Inhibidores de GSK3**

GSK3 es una enzima fascinante implicada en un gran número de acciones que además desencadenan múltiples sistemas de señalización intracelular. Muchas de las vías que usan GSK3 como regulador se han relacionado con enfermedades y pueden ser consideradas importantes dianas de una intervención terapéutica. Los inhibidores de GSK3 aparecen como prometedoras drogas para la farmacoterapia de muchas patologías agudas como el cáncer, la diabetes, infarto, desordenes psiquiátricos, inflamación y Alzheimer entre otras.

La inhibición de GSK3 mejora los daños en los procesos cognitivos. la inhibición de GSK3 disminuye los déficits cognitivos que se presentan en una gran variedad de modelos animales de enfermedades del sistema nervioso central, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, el síndrome X Frágil, el síndrome de Down, la enfermedad de Parkinson, la ataxia espinocerebelar de tipo 1, el daño traumático en cerebro y otros. Además, los inhibidores de GSK3 mejoran la habilidad cognitiva consecuencia de intervenciones terapéuticas como la irradiación craneal en tumores cerebrales (King *et al.*, 2013).

Dada la asociación que existe entre la actividad anormal de GSK3 $\beta$  y diversas enfermedades humanas, GSK3 $\beta$  constituye una importante potencial diana terapéutica, sobre todo porque su sobreexpresión aparece estrechamente relacionada con patologías, como por ejemplo la diabetes mellitus no insulino dependiente y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Alonso y Martinez, 2004).

En los últimos años, se han propuesto un gran número de moléculas pequeñas y capaces de atravesar las barreras biológicas como la barrera hematoencefálica o el tracto gastrointestinal como potenciales agentes terapéuticos. Es importante destacar la relevancia de que el agente terapéutico tiene que tener una diana bien definida y la

especificidad de la sustancia es un factor muy importante para focalizar la actuación del mismo y no afectar a otras cascadas de señalización (Alonso y Martinez, 2004).

#### **1.10.4. Inhibidores de caseína quinasa**

La importancia de la actividad de caseína quinasa 1 (CK-1) en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson y la ELA ha sido en los últimos tiempos una de las más prometedoras dianas terapéuticas para dichas enfermedades.

Las caseínas quinasas son serina/treonina fosfotransferasas multifuncionales que se expresan de manera ubicua en los organismos eucariotas y en levaduras, siendo CK-2 la primera que se descubrió (Burnett y Kennedy, 1954). La CK-1 se expresa ubicuamente en organismos eucariotas. Además, al menos tiene 7 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ , y  $\epsilon$ ) y sus variantes de *splicing* han sido caracterizadas en diferentes organismos (Gross y Anderson, 1998). Se comportan como enzimas constitutivas monoméricas y usan de manera exclusiva el ATP como donante de fosfato, y en general son independientes de cofactores (Flotow *et al.*, 1990). Se suelen inactivar mediante la fosforilación de un residuo C-terminal regulando así su actividad catalítica (Perez *et al.*, 2011). Los miembros de la familia de CK-1 están constitutivamente activos y pueden ser aislados como enzimas activas desde múltiples tipos celulares diferentes, y en todos los compartimentos subcelulares, incluyendo la membrana plasmática, el citosol y el núcleo. Se ha publicado que la mayoría de las isoformas de CK-1 se expresan en el estriado y en la corteza cerebral y que CK-1 regula la transmisión de sinapsis glutamatérgicas mediada por los receptores de NMDA (Perez *et al.*, 2011).

La CK-1 está implicada en diversas funciones biológicas (Knippschild *et al.*, 2005), como el transporte en la membrana, la regulación de la reparación del ADN, la morfología celular, y la modulación de Wnt/ $\beta$ -catenina y la vía de Hedgehog durante el desarrollo, y la regulación de los ritmos circadianos (Perez *et al.*, 2011).

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios en los que se remarca la importancia de la CK-1 en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en taupatías, como la enfermedad de Alzheimer. En esta patología se ha encontrado CK-1 en la matriz de los cuerpos de degeneración granulovascuales. Los patrones de colocalización revelan



que la isoforma CK-1 $\alpha$  aparece preferentemente asociada con lesiones neurofibrilares, mientras que la isoforma CK-1 $\delta$  colocaliza con los cuerpos de degeneración granulovascuales. Además, la proteína  $\beta$ -amiloide estimula la actividad de CK-1, contribuyendo a la fosforilación proteica anormal del Alzheimer (Chauhan *et al.*, 1993). Una combinación de la actividad de CK-1 $\delta$  y de GSK3 abarcan más de las tres cuartas partes de sitios de fosforilación que aparecen en los filamentos helicoidales emparejados de tau, indicando su papel conjunto en el desarrollo de la patología de Alzheimer (Perez *et al.*, 2011).

Se sabe que hay 29 sitios diferentes de fosforilación por CK-1 en el recombinante de TDP-43 (Kametani *et al.*, 2009). Por ello, CK-1 no solo juega un papel importante en las tapatías sino que también tiene importancia en las enfermedades degenerativas de la neurona motora como la ELA.

Por todo lo expuesto anteriormente, el uso de inhibidores de CK-1 puede ser una diana interesante para la generación de nuevas moléculas potencialmente terapéuticas que actúen sobre estas enfermedades neurodegenerativas.

## **2. OBJETIVOS**



En este trabajo, nos planteamos abordar el análisis de la toxicidad causada por el L-BMAA en tres sistemas: un cultivo de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) que nos ayudaron a establecer las bases de la neurodegeneración que causa este aminoácido, por otro lado se realizaron ensayos con tratamientos *in vivo* con el L-BMAA en ratas para evaluar la afectación cerebelar y la expresión de síntomas similares a la ELA esporádica, y también se hicieron estudios incubando *in vitro* con L-BMAA en cortes de cerebelo para establecer el mecanismo de acción del tóxico en un sistema que no sea una línea celular inmortalizada en el que poder analizar el papel neuroprotector de moléculas potencialmente terapéuticas como es la esfingosina-1-fosfato.

El objetivo principal es el análisis de la citotoxicidad causada por el N-β-metilamino-L-alanina (L-BMAA) y la valoración de la afectación cerebelar.

En concreto, nos planteamos:

1. Establecimiento y estudio de las condiciones de citotoxicidad causada por el L-BMAA sobre la línea celular SH-SY5Y.
2. Análisis de marcadores bioquímicos característicos de neurodegeneración sobre el modelo celular.
3. Ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas sobre el modelo celular creado con células SH-SY5Y por intoxicación con L-BMAA.
4. Tratamiento de ratas con L-BMAA y análisis del daño cerebelar causado tanto ultraestructuralmente como mediante la observación de los parámetros bioquímicos previamente establecidos.
5. Estudio de la afectación en cortes de tejido cerebelar de rata mediante tratamiento *in vitro* con L-BMAA.
6. Análisis del papel neuroprotector de la esfingosina-1-fosfato y su mecanismo de acción en el cerebelo tratado *in vitro* con el L-BMAA.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### **3.1. Experimentación realizada con una línea celular**

#### **3.1.1. Línea celular y condiciones de cultivo**

Las células utilizadas proceden de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (número de ATCC: CRL-2266). Se trata de una línea celular de neuronas dopaminérgicas que han sido ampliamente utilizadas como modelo neuronal en desórdenes neurodegenerativos como por ejemplo la enfermedad de Parkinson.

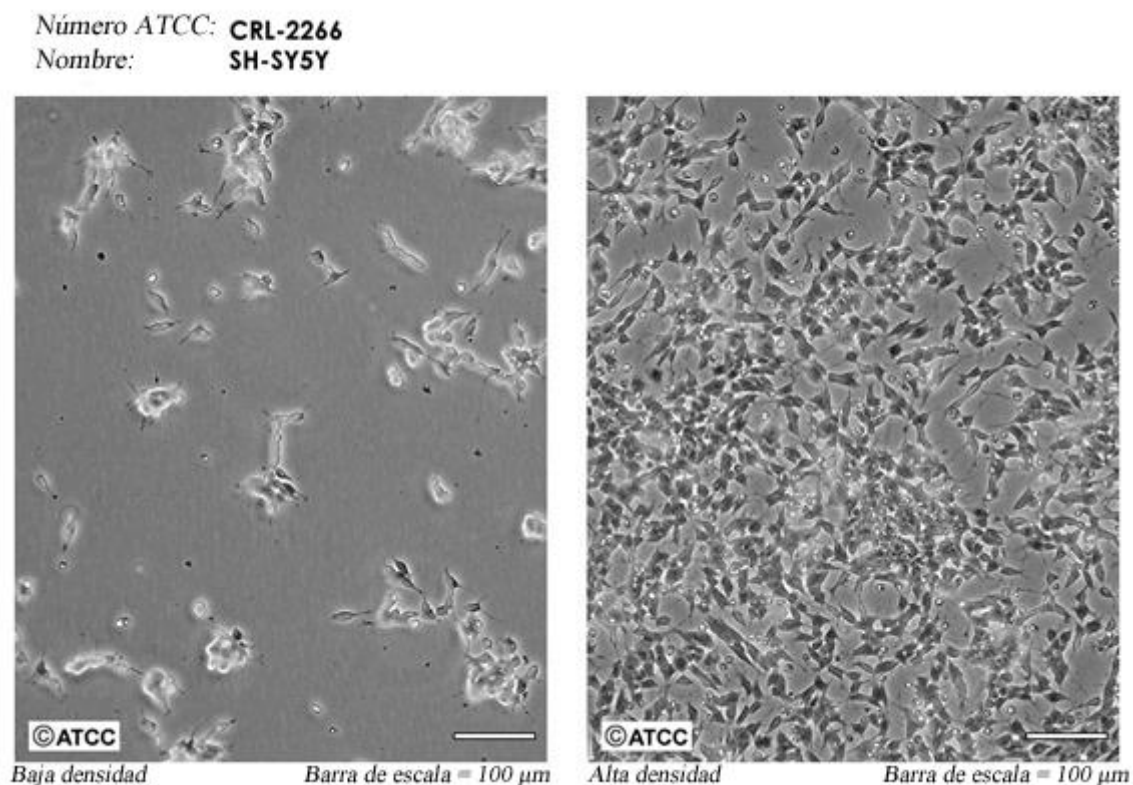
Todos los experimentos realizados con células *in vitro* fueron llevados a cabo en un ambiente de asepsia proporcionado por una campana de flujo laminar.

En todos los casos las células se cultivaron en medio DMEM (*Sigma*) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado (*Lonza*), una mezcla de estreptomicina/penicilina al 1% (*Invitrogen*) y 1% de glutamina (*Invitrogen*) en un incubador humidificado a una temperatura constante de 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando una placa de células llega a la confluencia, se levantan las células con tripsina (*Lonza*) y se extienden a dos placas. Este proceso se realizó un máximo de 35 veces.

#### **3.1.2. Diseño experimental general para los ensayos celulares**

En todos los casos las células alcanzaron el 80% de confluencia (alta densidad, aproximadamente  $8 \times 10^6$  células), excepto en los experimentos de microscopía confocal con sondas, donde la confluencia fue de alrededor del 50% para poder captar imágenes de células individualizadas (Figura 17).





**Figura 17.** Imagen de alta y baja densidad celular de las células SH-SY5Y. Figura adaptada de ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx>).

Para llevar a cabo los distintos tratamientos con L-BMAA (*Sigma*) previamente se diluye el producto en  $\text{NaHCO}_3$  10 mM para asegurarnos la formación del carbamato de L-BMAA. Después de realizar un estudio de dosis-respuesta y tiempos de acción, la concentración ensayada en los experimentos es de 10 mM de L-BMAA en el medio de cultivo y la exposición al agente neurotóxico se estableció en 24 horas (Lee y McGeer, 2012; Okle *et al.*, 2013; Muñoz-Sáez *et al.*, 2013).

Para el ensayo de protectores, se realizaron experimentos poniendo el protector y el neurotóxico al mismo tiempo sobre el cultivo y también aplicando primero el protector y posteriormente el L-BMAA.

Para los experimentos de fraccionamiento subcelular y extracción de fracción proteica insoluble, con el fin de obtener una cantidad de proteínas suficiente para su análisis posterior por western blot, se utilizaron 2 placas de 10 cm de diámetro a confluencia por cada punto a ensayar (aproximadamente  $16 \times 10^6$  células).

Todos los experimentos presentados fueron realizados al menos por triplicado.

### 3.1.3. Ensayos de viabilidad celular por MTT

Se utilizó el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). Este método se basa en que la sal de tetrazolio, MTT, de color amarillo, atraviesa las membranas celulares y es reducida por las reductasas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial de las células vivas, formando unos gránulos de formazán azules oscuros, que serán solubilizados con isopropanol ácido (ácido clorhídrico 0,06 N en isopropanol). La valoración del formazán se lleva a cabo mediante medida espectrofotométrica de absorbancia a 570 nm permitiendo la cuantificación de la viabilidad celular (Alley *et al.*, 1988).

Los ensayos de viabilidad celular fueron llevados a cabo con las células cultivadas en placas de 96 pocillos. Los ensayos se realizaron seis veces para cada uno de los tratamientos. Tras la incubación de 24 horas con los tratamientos (Tabla 2), se añadió el MTT (*Calbiochem*), a una concentración final de 5 mg/ml. A continuación, se incubaron las células durante 4 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> para mantener la viabilidad del cultivo y posibilitar la formación del formazán. Una vez transcurrido el tiempo se solubilizó el formazan con el isopropanol ácido. La lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro de placas (*Power-Wavex microplate spectrophometer, Bio-Tek Instruments*).

Molécula	Concentración	IC50 frente a CK-1δ	Acción
L-BMAA	10 mM	--	Excitotoxicidad neuronal
IGS2.7	100 nM	0,023 ± 0,002 μM	Inhibidor de CK-1δ (ATP competitivo)
IGS2.7	10 nM	0,023 ± 0,002 μM	Inhibidor de CK-1δ (ATP competitivo)
IGS2.55	10 nM	0,010 ± 0,001 μM	Inhibidor de CK-1δ (ATP competitivo)
IGS2.44	66 nM	0,033 ± 0,002 μM	Inhibidor de CK-1δ (ATP competitivo)
Taurina	100 nM	--	Neuroprotector intrínseco
Taurina	5 mM	--	Neuroprotector intrínseco
DIP5.5	11,1 μM	11,12 ± 2,01 μM	Inhibidor de CK-1δ
Ácido Isolecanórico	64 μM	12 ± 0,001 μM	Inhibidor de GSK3
S1P	1 μM	--	Esfingolípido neuroprotector

**Tabla 2.** Cuadro resumen de los tratamientos analizados por MTT. Se detalla el nombre de la molécula, la concentración ensayada, la IC50 frente a CK-1δ y la acción general de cada uno de ellos.

### 3.1.4. Medida de los tipos de muerte celular por citometría de flujo

Con el fin de analizar los tipos de muerte celular acontecidos como consecuencia del tratamiento con el agente neurotóxico L-BMAA, se recurrió a la citometría de flujo para analizar el porcentaje de necrosis y la cuantificación de la muerte celular programada o apoptosis hallada en el cultivo. La muerte celular se valoró mediante un kit comercial de anexina V-FITC e ioduro de propidio (*Annexin V-FITC Apoptosis Detection, Calbiochem*). La anexina es el nombre común de un grupo de proteínas celulares que se unen a fosfolípidos en presencia de calcio. Las alteraciones celulares que ocurren durante un proceso apoptótico incluyen una fase inicial de pérdida de asimetría de los fosfolípidos. En este proceso, la fosfatidilserina de la cara interna de la membrana celular se transloca a la cara externa pudiéndose unir los conjugados de anexina V a estos fosfolípidos y así detectar las células apoptóticas tempranas. La anexina empleada

en este kit, esta conjugada con un colorante fluorescente que es el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Por otro lado, el ioduro de propidio es un agente intercalante del ADN que emite en el espectro ultravioleta. Este agente solo puede acceder al material genético si las membranas celulares han sido dañadas, como ocurre en el caso de la necrosis o de una apoptosis muy avanzada. Por tanto, por citometría de flujo se pueden distinguir dentro de la población de células muertas entre las células en las que se ha desencadenado el comienzo de la apoptosis, positivas para anexina V y negativas para ioduro de propidio, y entre las células positivas para ioduro de propidio, que serán necróticas o células con un proceso apoptótico en estado avanzado.

En estos ensayos las células fueron cultivadas en placas de 3 cm de diámetro y se realizaron 5 réplicas. Tras los distintos tratamientos ensayados, se recogieron todas las células, tanto las adheridas a la placa como las presentes en el sobrenadante, se centrifugaron y se lavaron con PBS (*Sigma*) frío. A continuación, se procedió al marcaje primero con anexina V y después con ioduro de propidio a temperatura ambiente y en oscuridad a una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células/ml. Antes de que transcurriera una hora se realizó la medida en el citómetro de flujo.

### **3.1.5. Marcaje con sondas, microscopía confocal y lector de fluorescencia**

Se realizaron experimentos de microscopía confocal con células a un 50% de confluencia para poder analizarlas de forma individualizada en placas de 3 cm de diámetro. Las sondas fluorescentes, empleadas para estos experimentos, presentan una cola de acetoximetiléster (AM) que permeabiliza las células permitiendo el acceso de la sonda. Para estos experimentos, se procedió según el protocolo descrito para cada una de las sondas utilizadas. Las placas que contienen las células marcadas, se colocaron en una cámara sellada y termostatzada en el microscopio confocal, el L-BMAA fue adicionado a las placas mientras se observaban las imágenes de los marcajes con las sondas fluorescentes (Tabla 3). Se utilizó un microscopio confocal (*Leica*) y el programa informático para la edición de imágenes *Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)*. En todos los casos, se analizó la fluorescencia de al menos 40 células por cada experimento y se normalizó la media respecto al punto inicial.

En el caso de los experimentos realizados en el lector de placas de fluorescencia (*FLUOSTAR<sup>TM</sup>*) se cultivaron las células en placas de 96 pocillos. Se cargaron los

pocillos con la sonda fluorescente y se valoraron las unidades relativas de fluorescencia. En todos los casos, se representa una media de los valores de al menos 20 pocillos de cada tratamiento.

Medida obtenida	Sonda utilizada	$\lambda$ exc/emi	Valoración	Casa comercial
ROS	DHR123	507/529 nm	M. confocal	Anaspec
ROS	H <sub>2</sub> DCFDA	485/520 nm	Lector fluorescencia	Anaspec
Potencial de membrana mitocondrial	TMRM	549/573 nm	M. confocal	Anaspec
Calcio mitocondrial	rhod-2 AM	549/578 nm	M. confocal	Anaspec

**Tabla 3.** Sondas fluorescentes utilizadas. Se detalla la medida que se obtiene, la sonda, la longitud de onda ( $\lambda$ ) de excitación y de emisión en nanómetros, la técnica mediante la que se valoró y la casa comercial de cada una.

### 3.1.6. Generación de especies reactivas de oxígeno

Para medir las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la acción del L-BMAA se utilizó como sonda la dihidrorodamina 1,2,3 (DHR1,2,3). Esta sonda es un indicador no fluorescente y sin carga, que difunde a través de las membranas pasivamente hasta ser oxidado por ROS. En ese momento, se convierte en rodamina 1,2,3, que es catiónica y fluorescente y que se localiza en las mitocondrias. De esta manera, se van a medir las especies reactivas de oxígeno producidas principalmente por las mitocondrias.

En nuestro caso las células, se cargaron durante 30 minutos con DHR1,2,3 (10  $\mu$ M). La primera imagen fue adquirida a tiempo 0, considerando este valor como el 100% de fluorescencia. Inmediatamente después de la primera imagen se añadió el L-BMAA. A continuación, las imágenes fueron adquiridas cada 2 minutos.

Otra sonda empleada para valorar el efecto producido del L-BMAA sobre estrés oxidativo, fue la 2',7'-diclorodihidrofluorescein diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). Cuando esta sonda está reducida no es fluorescente, pero después de la oxidación celular y la eliminación de los grupos acetato por las esterasas celulares, se convierte en una sustancia fluorescente. El análisis de estos ensayos se llevó a cabo en un lector de fluorescencia (*FLUOSTAR<sup>TM</sup>*), con una concentración de H<sub>2</sub>DCFDA de 0,47 mM, tomando 26 medidas (denominadas ciclos) con un intervalo de tiempo de 1 minuto 30

segundos con respecto a la medida anterior. Inicialmente, se dejaron pasar algunos ciclos para que se estabilice la fluorescencia de la sonda. La adición del L-BMAA se realizó en el ciclo 16.

### **3.1.7. Potencial de membrana mitocondrial**

Para llevar a cabo la medida del potencial de membrana se empleó el éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM). Este agente es un fluorescente catiónico permeable a las células que es atrapado por las mitocondrias activas, utilizándose para la medida de la despolarización de membrana mitocondrial. Para realizar estos experimentos, las células se cargaron con TMRM (1  $\mu$ M) durante 15 minutos. La primera imagen fue adquirida a tiempo 0, siendo este valor el 100% de fluorescencia. Inmediatamente después de la primera imagen se añadió el L-BMAA. A partir de entonces, las imágenes fueron adquiridas cada 2 minutos.

### **3.1.8. Medida de calcio mitocondrial**

La medida de calcio mitocondrial, se realizó utilizando la sonda rhod-2 AM. Esta sonda es la más empleada para la valoración del calcio intracelular, dado que su fluorescencia se prolonga mucho en el tiempo. Para medir solo el calcio mitocondrial, las células fueron pretratadas durante 15 minutos con thapsigargina 2  $\mu$ M (*Sigma*). Este producto es un inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$ /ATPasa del retículo endoplásmico, por lo que impide que el calcio pueda salir del retículo, así todo el calcio que estamos valorando en el citosol procede de la liberación de calcio por parte de las mitocondrias. A continuación, se cargaron las células con rhod-2AM (2,2  $\mu$ M). Tras la primera imagen, se adicionó el L-BMAA y a partir de entonces las imágenes fueron adquiridas cada 60 segundos.

### **3.1.9. Fraccionamiento subcelular para valorar GSK3**

Los grupos experimentales fueron: control, L-BMAA 10 mM, S1P 1  $\mu$ M y S1P con L-BMAA. Además se utilizó el inhibidor de PI3K, wortmanina (Wrt, de *Sigma*), a una concentración de 10 nM, que va a bloquear esta vía canónica de supervivencia celular. En todos los casos cada tratamiento se llevó a cabo durante 24 horas y por quintuplicado.

Para estos experimentos, se cultivaron las células en placas de 10 cm de diámetro y se usaron un mínimo de 2 placas por cada punto de tratamiento ensayado. Se obtuvieron fracciones de extracto total, citosol y núcleo según el método descrito por Miguel *et al.* (2001). Todo el protocolo se llevó a cabo a 4°C. Las células se recogieron tras los distintos tratamientos levantándolas mecánicamente con medio de cultivo y sin usar tripsina. Seguidamente, se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). Las células se lisaron con un homogeneizador Potter Dounce de tipo B. Este lisado constituye el extracto total, del cual se recogió una alícuota. El resto de este extracto se centrifugó 10 min. a 800 x g y a 4 °C. El pellet obtenido constituye la fracción nuclear, y fue resuspendido en 100 µl de medio C: Tris-HCl 50 mM, sacarosa 1,6 M, MgSO<sub>4</sub> 5 mM conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*) y 10 µg de DNasa. Por otro lado, el sobrenadante se centrifugó de nuevo durante 30 min. a 100.000 x g y a 4 °C. El sobrenadante resultante constituye la fracción citosólica. De cada una de las fracciones se obtuvieron dos alícuotas, una de 10 µl para la posterior valoración de proteínas (punto 3.4.1) y otra con el resto de volumen para continuar el proceso (punto 3.4.2). Ambas alícuotas obtenidas para cada fracción fueron guardadas a -80°C para su posterior análisis.

### **3.1.10. Extracción de proteínas insolubles para valorar TDP-43**

Para analizar las alteraciones de TDP-43, es necesario realizar una extracción de la fracción proteica insoluble presente en las células. Para cada punto experimental se utilizaron dos placas de 10 cm de diámetro a confluencia. Este experimento se realizó un total de 5 veces, aislándose la fracción insoluble de células control y de células tratadas con L-BMAA 10 mM durante 24 horas. Todo el protocolo se realizó a 4 °C.

Tras los distintos tratamientos, las células se recogieron levantándolas mecánicamente con medio de cultivo y sin usar tripsina. A continuación, se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, NP-40 al 1%, SDS al 1%, Deoxicolato sódico 0,5 mM, conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). Esta suspensión se homogeneizó mediante sonicación, durante 15 segundos, dos veces, con un 20% de amplitud. A continuación, se centrifugaron los tubos durante 30 minutos a 100.000 x g y

a 4° C. El pellet obtenido se resuspendió en 150 µl de tampón de urea: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 4% y Tris-HCl 50 mM a pH 8,5. Seguidamente, se volvió a sonicar cada tubo igual que en el paso anterior y se centrifugaron durante 30 minutos a 100.000 x g y a 4 °C. Este proceso se repitió dos veces. El sobrenadante obtenido de estas dos centrifugaciones contiene la fracción de proteínas insolubles presente en las células (Tsai *et al.*, 2010). De esta muestra, se guardó a -80°C una alícuota de 10 µl para valorar proteínas (punto 3.4.1) y otra alícuota con el volumen restante para su posterior análisis por electroforesis (punto 3.4.2).

### **3.2. Estudios *in vivo* de animales tratados con L-BMAA**

Como animales de experimentación se utilizaron machos de rata, *Rattus norvegicus*, variedad albina, cepa Wistar (Harlan Laboratories, que fueron mantenidos en condiciones de estabulario con un régimen de fotoperiodo controlado (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y con comida y bebida *ad libitum*. Los protocolos realizados con los animales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

El tratamiento de L-BMAA (*Sigma*) se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal, ya que es la vía de administración más sencilla para causar un déficit neurológico en ratas (Polski *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990). El tratamiento se comenzó justo al destete de las ratas, en su día 21 de vida y la dosis fue de 300 mg/Kg/día durante 5 días consecutivos.

En el tratamiento *in vivo* no es necesario diluir el L-BMAA con bicarbonato, ya que en el organismo de la rata, el L-BMAA va a formar el carbamato después de atravesar la barrera hematoencefálica y no antes. Además, si el carbamato se inyecta intraperitonealmente, su paso a través de la barrera hematoencefálica queda muy limitado, ya que mimetiza al glutamato y el flujo pasivo de glutamato a través de la barrera es menor del 1%, por lo tanto, el L-BMAA no llegaría a causar el daño neurotóxico que perseguimos (Smith, 2000). El tratamiento de los animales con VP2.51 se realizó también por inyección intraperitoneal en las ratas tratadas con L-BMAA justo al terminar las inyecciones con el aminoácido. La dosis utilizada fue de 2,5 mg/Kg/día durante 15 días consecutivos tras los 5 días de inyección con L-BMAA.



En estos experimentos se trataron 29 ratas con L-BMAA disuelto en PBS (de ellas a 9 se les inyectó después el VP2.51), 9 ratas se trataron con VP2.51 sólo y se formó un grupo control con otras 20 ratas, fueron tratadas en este caso con PBS solo. Durante el tratamiento, las ratas inyectadas fueron sometidas a un control ponderal, para controlar el desarrollo normal de los animales. En este caso, no se encontraron modificaciones con respecto a las ratas control. Se sabe que el L-BMAA no afecta a las funciones vitales de las ratas en las condiciones de tratamiento descritas previamente, aunque si se han encontrado alteraciones debido a su excitotoxicidad (de Munck *et al.*, 2013a).

Los animales fueron evaluados periódicamente, de acuerdo con de Munck *et al.* (2013b). La evaluación de su estado neurológico se determinó usando tres test realizados periódicamente en las ratas: la observación de la deambulaci3n, el test de suspensi3n por la cola y el test de fuerza. Estas tres aproximaciones no tienen una contribuci3n de igual peso a la hora de establecer el valor de evaluaci3n neurol3gica, sino que el m3s importante de ellos es la suspensi3n por la cola, que representa un 70%, contribuyendo cada uno de los otros test con un 15%. Durante la deambulaci3n, se observa el control postural y la manera de posicionar las patas traseras durante la locomoci3n, haciendo caminar a la rata en un pasillo de 20 × 20 × 100 cm. Con el test de suspensi3n por la cola se suspende al animal, sujet3ndolo por la cola, a unos 10 cm de la superficie. As3 se valora la capacidad de mantener las extremidades traseras en una posici3n normal neutral, en forma T como se describe para los roedores, tambi3n se evalúa la rigidez de las patas as3 como el pataleo en esta postura. El test de fuerza se lleva a cabo sujetando al animal por la cola y ejerciendo una leve fuerza en el sentido contrario a su marcha. Con este test se evalúa la capacidad de ofrecer resistencia al tir3n o el ángulo de apertura que sufren las extremidades traseras, valorando si estas sobresalen de la superficie corporal o no (de Munck *et al.*, 2013b).

Cuando los animales tratados con L-BMAA mostraron una evaluaci3n neurol3gica al menos de 7, fueron sacrificados para llevar a cabo cada uno de los ensayos descritos a continuaci3n. La evaluaci3n neurol3gica de 7 se corresponde con una mala posici3n de las patas y una deambulaci3n lateralizada. Cuando se les suspende de la cola, en el test de suspensi3n por la cola, se observa que las patas traseras est3n relajadas y que permanecen muy juntas apuntando hacia la parte anterior del cuerpo. Durante el test de fuerza, los animales tratados muestran una ausencia de resistencia al tir3n de la cola, y

las patas se les resbalan por fuera de la superficie del cuerpo (de Munck *et al.*, 2013b). En el momento del sacrificio de los animales tratados, siempre se sacrificó al mismo tiempo a los animales controles correspondientes, para que tuvieran exactamente la misma edad y no se alteraran los resultados de la investigación (Tabla 4).

Tratamiento <i>in vivo</i>	GSK3 $\beta$ (pto 3.2.1.1)	TDP-43 (pto 3.2.1.2)	LC3II (pto 3.2.2)	IHQ MF (pto 3.2.3)	ME Conv. (pto 3.2.4.1)	IHQ ME (pto 3.2.4.2)
<i>Control</i> ( <i>n</i> =20)	4	4	3	3	3	3
<i>L-BMAA</i> ( <i>n</i> =20)	4	4	3	3	3	3
<i>VP2.51</i> ( <i>n</i> =9)	3	--	3	3	--	--
<i>VP2.51+L-BMAA</i> ( <i>n</i> =9)	3	--	3	3	--	--

**Tabla 4.** Cuadro de tratamientos realizados con L-BMAA en los animales, y número de animales que con una evaluación neurológica de 7 fueron destinados para cada uno de los análisis realizados. Siglas: pto: apartado de material y métodos, IHQ MF: inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia, ME conv.: microscopía electrónica convencional, IHQ ME: inmunohistoquímica para microscopía electrónica.

### 3.2.1. Obtención de cerebelo para análisis de GSK3 $\beta$ y TDP-43 por western blot

Se sacrificaron 4 animales control y 4 animales tratados para valorar GSK3 $\beta$  y otros 4 animales de cada grupo para valorar TDP-43. En el caso de los animales tratados con VP2.51 se sacrificaron 3 animales tratados con VP2.51 y otros 3 tratados con VP2.51 y L-BMAA, para así valorar GSK3 $\beta$ .

Los animales fueron sacrificados anestesiándolos con sedación fuerte de isoflurano (IsoFlo<sup>®</sup>, Abbott Animal Health) al 5% en O<sub>2</sub>. Se extrajo el cerebelo completo eliminando las meninges. El tejido fue incluido en Krebs: NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 11,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, a pH 7,4, y previamente gaseado durante media hora con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>).

Tras la obtención del cerebelo, el tejido se troceó en pequeños cortes de 400 µm de espesor con un micrótopo McIlwain y se calculó el peso seco de tejido. Los cortes se resuspendieron en el volumen necesario de Krebs y a cada tubo se le añadieron 50 mg de tejido.

#### **3.2.1.1. GSK3β**

Para valorar GSK3β, se eliminó todo el Krebs y se añadieron 0,5 ml de tampón de Lisis I: Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). Seguidamente, los tubos se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos y se homogenizaron con un homogeneizador Potter Dounce de tipo B (20 pases) en cada tubo y realizando el proceso siempre en hielo. Este homogeneizado constituye el extracto total, del cual se tomaron alícuotas de 10 µl para valorar proteínas y de 100 µl para realizar los análisis por electroforesis. El resto del extracto total, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. El pellet obtenido, se resuspendió en 100 µl de medio C: Tris-HCl 50 mM, sacarosa 1,6 M, MgSO<sub>4</sub> 5 mM al cual se le añadió un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*) y 10 µg DNasa, constituyendo la fracción nuclear. El sobrenadante resultante se centrifugó durante 60 minutos a 33.000 rpm y 4°C. El sobrenadante obtenido será la fracción citosólica (metodología adaptada de Miguel *et al.*, 2001). Las muestras pueden permanecer congeladas a -80°C hasta el momento de su uso.

#### **3.2.1.2. TDP-43**

Para analizar las alteraciones existentes en TDP-43, es necesario realizar una extracción de la fracción proteica insoluble presente en los tejidos. Para ello, una vez obtenido el cerebelo, se eliminó todo el Krebs y se añadieron 0,5 ml de *Buffer Low Salt* (tampón LS): Tris-HCl 50 mM, sacarosa 10% y EDTA 5 mM, añadiendo en el momento de su uso DTT 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). A continuación, se homogenizaron los fragmentos de tejido con un Potter Dounce de tipo B (50 pases) siempre en hielo. Se centrifugaron durante 30 minutos a 25.000 x g y 4 °C. Al pellet obtenido se le añadió tampón Tritón X (5 ml/g de tejido): 1% Tritón X100 y 0,5 M de NaCl en tampón LS. Seguidamente, se centrifugaron a 180.000 x g, durante 30 minutos y a 4 °C. El pellet resultante fue

sometido a una desmielinización, para lo cual se lavó con tampón Tritón X con un 30% de sacarosa, se volvió a centrifugar a 180.000 x g durante 30 minutos y a 4 °C y el pellet resultante se resuspendió en tampón Sarcosil: 1% N-laurilsarcosina, 0,5 M de NaCl en tampón LS. Se incubaron los tubos a 22 °C y en agitación durante 1 hora y se centrifugaron de nuevo a 180.000 x g, durante 30 minutos y a 4 °C. El pellet resultante se resuspendió en 100 µl de tampón de urea: urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris-HCl 50 mM; pH 8,5. Por último, las muestras se centrifugaron a 25.000 x g, durante 30 minutos y a 22 °C, el sobrenadante resultante es la fracción proteica insoluble, se alicuotaron 10 µl para valorar proteínas (punto 3.4.1), y el resto se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso. Metodología adaptada en nuestro laboratorio de Sampathu *et al.* (2006) modificada por Leverenz *et al.*, 2007.

### 3.2.2. LC3B

Para la valoración de LC3B, 3 animales control, 3 animales tratados con L-BMAA, tres animales tratados con VP2.51 y 3 animales con el doble tratamiento (VP2.51+L-BMAA), fueron sacrificados anestesiándolos con sedación fuerte de isoflurano (*IsoFlo*®, *Abbott Animal Health*) al 5% en O<sub>2</sub>. Se extrajo el cerebelo completo eliminando las meninges. A continuación, se disolvió el tejido en tampón RIPA: Tris-HCl 50mM a pH 7,4, NaCl 50 mM, nonidet P-40 1%, EDTA 1 mM, PMSF 1mM, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, a una proporción de 10 µl de tampón por 1 mg de tejido. La mezcla se sonicó durante 2 minutos, con pulsos de 2 segundos de sonicación y 2 segundos de descanso, a una amplitud del 40%. Una vez homogeneizadas las muestras se procedió a la valoración de proteínas (punto 3.4.1) y a la electroforesis (punto 3.4.2). Protocolo adaptado de Zhang *et al.*, 2011.

### 3.2.3. Perfusión de rata para inmunohistoquímica de fluorescencia

Para realizar el exanguinado y perfusión de los animales de cada grupo experimental, con el fin de realizar una inmunohistoquímica de fluorescencia, se procedió a anestesiarse los animales con isoflurano (*IsoFlo*®, *Abbott Animal Health*) al 1,5% en O<sub>2</sub>. A continuación, se fijó el animal en un corcho de disección, y se le realizó una laparotomía medial por planos a la altura del diafragma. Se cortó la caja torácica y rápidamente se procedió a realizar una punción transcárdica. La perfusión realizada es en circuito abierto, así que se canula el ventrículo izquierdo y se realiza un corte en la

aurícula derecha. Primero, se perfundió el animal con una solución de exanguinación compuesta de suero salino al 0,9% frío con un 1% de  $\text{NO}_2\text{Na}$  y 400 U de heparina sódica (*Hospira productos farmacéuticos y hospitalarios*, 1%). Cuando por la aurícula el líquido de exanguinación sale transparente se continúa con la fijación. El líquido de fijación es formalina al 10% en PBS frío. Cuando se observó que el animal ya ha sido fijado (aproximadamente cuando han pasado unos 250 ml de las dos soluciones previamente descritas) se extrajo el cerebelo y se procedió a su fijación por inmersión en formalina al 10%, a 4°C durante al menos 24 horas.

Tras la fijación del tejido, se procede a su crioprotección. Para ello se realizan rodajas finitas del tejido y se sumergieron en sacarosa al 30% en PBS a 4°C. Al principio, los cortes se quedan flotando en la sacarosa, cuando comienzan a hundirse es cuando el tejido está correctamente criopreservado (aproximadamente unas 24 horas).

A continuación, cada una de las rodajas de tejido se incluyeron sumergiéndolas en Tissue-Tek (*Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound*, Sakura) y se congelaron a -20°C hasta el momento del corte del tejido.

El cerebelo fue cortado en un criostato (*Leica Biosystems*, CM 1850) con cuchilla desechable (*Leica Biosystems*, modelo 818). Los cortes de tejido fueron de 10  $\mu\text{m}$  de grosor y recogidos a -23°C con portaobjetos recubiertos dos veces con una disolución de gelatina (1 g de gelatina y 0,1 g de sulfato de cromo y potasio dodecahidratado, ambos de *Merk*, en 200 ml de agua destilada). Una vez recogidos los cortes del tejido en el criostato, se dejaron los portas una hora a temperatura ambiente y a continuación se congelaron a -20°C hasta el momento de hacer la inmunofluorescencia sobre las muestras.

Para la realización del doble marcaje por inmunofluorescencia, todo el protocolo se realiza en una cámara húmeda, para que las muestras nunca se queden secas y a oscuras. En todos los experimentos se añadió un control negativo incubando con anticuerpo secundario, pero sin anticuerpo primario, para descartar uniones inespecíficas. En ningún caso se obtuvo marcaje inespecífico. Inicialmente, se sacaron los portas del congelador y se dejaron una hora a temperatura ambiente. Seguidamente, se hidrataron las muestras con PBS. La permeabilización de las muestras se lleva a cabo con PBS (*Sigma*) + TritónX-100 al 0,25% (*Sigma*) durante 15 min, y se bloquearon con PBS +

TritónX-100 al 0,1% + albúmina de suero bovino (BSA, *Sigma*) al 10% p/v durante 45 min. A continuación, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (A) diluido a la concentración que figura en el punto 3.5 en PBS + TritónX-100 al 0,1% + BSA al 10% p/v o/n en una cámara húmeda y a 4°C. Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS + TritónX-100 al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (para A) diluido (1:100) tal y como figura en el punto 3.5 en PBS + TritónX-100 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. Tras la incubación, se hicieron lavados con PBS + TritónX-100 al 0,25% y se volvió a bloquear con PBS + TritónX-100 al 0,1% + BSA al 10% p/v durante 45 min. A continuación, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario (B) diluido tal y como figura en el punto 3.5 en PBS + TritónX-100 al 0,1% + BSA al 10% p/v o/n (*over night*) en una cámara húmeda y a 4°C. Al día siguiente, se realizaron lavados con PBS + TritónX-100 al 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (para B) diluido (1:100) en todos los casos (punto 3.5) en PBS + TritónX-100 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad. Tras la incubación se hicieron lavados con PBS + TritónX-100 al 0,25%, se lavaron un par de veces con PBS solo y se procedió al montaje. El medio de montaje utilizado es DAPI (1µg/ml) disuelto 1:1000 en *Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Life Technologies)*. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio confocal (*Leica*). El programa informático para la edición de imágenes fue *Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF)*.

#### 3.2.4. Perfusión de rata para microscopía electrónica

Los animales fueron sacrificados bajo anestesia general, mezcla de ketamina (*Imalgene 1000<sup>®</sup> de Merial*) / xilacina (*Rompun<sup>®</sup> de Bayer*) (ketamina 100 mg/ml con un 2% de xilacina) inyectada intraperitonealmente. A continuación, se fijó el animal en un corcho de disección, y se le realizó una laparotomía medial por planos a la altura del diafragma. Se cortó la caja torácica y rápidamente se procedió a realizar una punción transcardiaca. La perfusión es en circuito abierto así que se canula el ventrículo izquierdo y se realiza un corte en la aurícula derecha. Primero, se perfundió el animal con una solución de exanguinación compuesta de suero salino al 0,9% frío con un 1% de NO<sub>2</sub>Na y 400 U de heparina sódica (*Hospira productos farmacéuticos y hospitalarios, 1%*). Cuando por la aurícula el líquido de exanguinación sale transparente se continúa con la fijación. Seguidamente, se perfundió con una solución de fijación consistente en una disolución

de paraformaldehído al 4% (*Electron Microscopy Science*), glutaraldehído al 2,5% (*TAAB Laboratory and Microscopy*) en tampón fosfato 0,1 M; pH 7,3. Una vez perfundido el animal, se extrajo el cerebelo y se hicieron fragmentos del mismo de 4 mm de diámetro máximo.

#### **3.2.4.1. Muestras para microscopía electrónica convencional**

A continuación, se sumergió el tejido en la solución de fijación con la que se ha perfundido el animal previamente (paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1 M; pH 7,3) durante 4 horas y a 4°C. Después, el tejido es post-fijado durante 1 hora en una solución 1:1 de tetraóxido de osmio 2% (*Electron Microscopy Science*) y ferrocianuro potásico acuoso 3% (*Panreac*). El tejido fue deshidratado con diluciones seriadas de acetona incluyendo finalmente las muestras en el 100% de resina Spurr (*TAAB Laboratory and Microscopy*). Los cortes ultrafinos fueron teñidos con citrato de plomo de Reynold. Las micrografías electrónicas fueron obtenidas a 80 kV con un microscopio electrónico *Jeol 1010* equipado con una cámara *Megaview*. El programa informático para la edición de imágenes fue *Soft Image Viewer* (*siViewer*, *Olympus*).

#### **3.2.4.2. Muestras para inmunohistoquímica**

El tejido seleccionado para inmunohistoquímica se sumergió en una solución de fijación compuesta por paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 0,1% en tampón fosfato 0,1 M; pH 7,3 durante 1 hora y a 4°C. Transcurrido este tiempo, se realizaron lavados con PBS y las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en diluciones seriadas frías de etanol y fueron lentamente embebidas por Lowicryl K4M (*Poly Science*) a -30°C. La resina K4M fue polimerizada bajo luz ultravioleta durante 48 horas a -30°C y 24 horas a temperatura ambiente. La deshidratación a baja temperatura, el embebido del tejido y la polimerización fueron llevados a cabo con un sistema de sustitución automático en frío (*AFS*, *Leica*). Las secciones ultrafinas (70 nm) fueron obtenidas con un ultramicrotomo (*Ultracut E*, *Reichert-Jung*) y fueron solubilizadas en una solución de glicina (*Sigma*) 0,1 M en PBS (*Sigma*) con un 5% de BSA (*Sigma*). Las rejillas con las secciones fueron incubadas toda la noche a 4°C con los anticuerpos correspondientes diluidos en PBS (tabla 6) con 1% de BSA. Tras lavar con PBS, las secciones fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario, cabra anti-conejo IgG (80

ng/ml) conjugado con partículas de oro coloidal de 10 nm (*British Biocell, Cardiff*) diluido 1:200 en PBS. Después de lavados con PBS y con agua ultrapura, las secciones fueron teñidas con un 2% de uranil acetato (*Panreac*) durante 20 minutos y con citrato de plomo de Reynold 3 minutos. Las imágenes fueron capturadas con microscopio electrónico de transmisión *Jeol 1010*. Los controles negativos se realizaron excluyendo el anticuerpo primario e incubando solo con anticuerpo secundario, y en ningún caso se obtuvo marcaje. El programa informático para la edición de imágenes fue *Soft Image Viewer (siViewer, Olympus)*.

### 3.3. Estudios en cortes de cerebelo de rata tratados con L-BMAA

Los experimentos fueron realizados con 46 machos de *Rattus norvegicus*, variedad albina, cepa *Wistar (Harlan Laboratories)*, que fueron mantenidos en condiciones con fotoperiodo controlado (ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) con agua y comida *ad libitum*. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

#### 3.3.1. Extracción de tejidos y tratamientos aplicados

Los animales fueron sacrificados anestesiándolos con isofluorano (*IsoFlo<sup>®</sup>, Abbott Animal Health*) 5% en O<sub>2</sub>. Se extrajo el cerebelo completo eliminando las meninges. El tejido fue incluido en Krebs: NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucosa 11,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, a pH 7,4, y previamente gaseado durante media hora con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>).

Tratamiento de los cortes de cerebelo <i>in vitro</i>	LDH* (pto 3.3.2)	GSK3β (pto 3.3.3)	TDP-43 (pto 3.3.4)	Capacidad antioxidante (pto 3.3.5)
<i>Control (n=11)</i>	6	3	3	5
<i>L-BMAA (n=11)</i>	6	3	3	5
<i>SIP (n=6)</i>	6	5	--	--
<i>SIP+L-BMAA (n=6)</i>	6	5	--	--
<i>VP2.51 (n=6)</i>	6	--	--	--
<i>VP2.51+L-BMAA (n=6)</i>	6	--	--	--



**Tabla 5.** Cuadro de tratamientos realizados in vitro, en el que se detalla el tratamiento y el número de cerebelos empleados en cada una de las técnicas: \*Nota: Para la valoración de LDH, al recogerse los sobrenadantes, los pellets de tejido pueden ser empleados tanto para el fraccionamiento subcelular (GSK3 $\beta$ ) como para la valoración de proteínas insolubles (TDP-43).

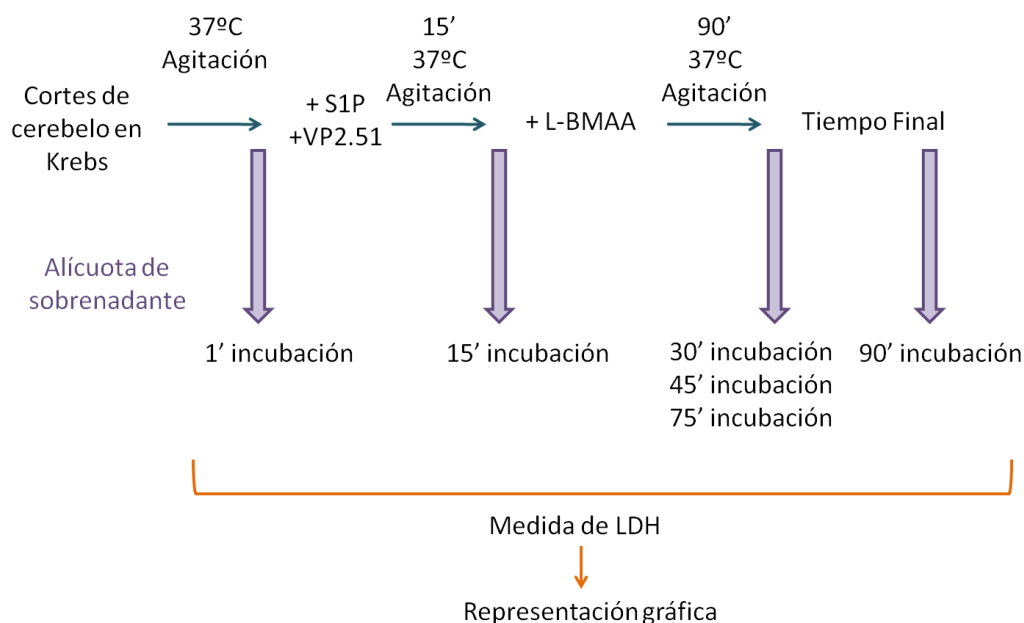
El protocolo descrito a continuación se realizó tanto para la obtención de fracciones subcelulares como para la extracción de la fracción insoluble proteica del tejido (Tabla 5).

Tras la obtención del cerebelo, el tejido se troceó en pequeños cortes de 400  $\mu$ m de espesor con un micrótopo McIlwain y se calculó el peso seco de tejido. Los cortes se resuspendieron en el volumen necesario de Krebs y a cada tubo se le añadieron 50 mg de tejido. Se dejó el tejido en el mínimo volumen posible (en 0,5 ml de Krebs). Se incubó el tejido en un baño metabólico a 37°C, con agitación y gaseo constante con carbógeno, durante 15 minutos. Seguidamente, se añadió el L-BMAA 10 mM, la S1P 1  $\mu$ M y el VP2.51 0,62  $\mu$ M y se dejaron actuar durante 1 hora y 30 minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación, se pasaron los tubos a un recipiente con hielo.

### 3.3.2. Medida de viabilidad celular en los cortes de cerebelo

Durante el procesamiento e incubación del tejido, es necesario conocer la viabilidad del mismo, ya que es interesante mantener intacta su funcionalidad. Para ello, se llevaron a cabo, en paralelo con los experimentos, ensayos de viabilidad valorando lactato deshidrogenasa (Figura 18).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una oxidoreductasa citoplasmática que cataliza la interconversión entre lactato y piruvato. Cuando un daño afecta a un tejido que contiene LDH, las células liberan esta enzima al torrente circulatorio, donde es detectada en niveles más altos de lo normal. Por ello, la LDH es medida habitualmente para evaluar la presencia de daño celular o tisular. Así, valorando la cantidad de LDH liberada al medio extracelular, se puede medir la viabilidad del tejido durante el ensayo. La enzima es valorada espectrofotométricamente con un kit comercial (*Lactate Dehydrogenase Assay Kit*, Abnova).



**Figura 18.** Esquema de la realización de los ensayos de LDH. Se detalla el tiempo de incubación de cada uno de los pasos, así como el momento de la recogida de las alícuotas de sobrenadante para su posterior valoración.

### 3.3.3. Fraccionamiento subcelular para valorar GSK3 $\beta$

Después de someter los cortes de tejido a los diferentes tratamientos, se eliminó todo el Krebs posible y se añadieron 0,5 ml de tampón de Lisis I: Tris-HCl 50 mM, EGTA 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 5 mM conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). Se dejaron los tubos durante 20 minutos a 4°C y se homogenizaron en un Potter Dounce de tipo B (20 pases) a 4°C. Se recogió una alícuota de 10  $\mu$ l para valorar proteínas y otra de 100  $\mu$ l que constituyen extracto total de tejido. El resto del homogeneizado, se centrifugó a 3000 rpm, 10 minutos y a 4°C. El pellet obtenido, se resuspendió en 100  $\mu$ l de medio C: Tris-HCl 50 mM, sacarosa 1,6 M, MgSO<sub>4</sub> 5 mM conteniendo un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa según las indicaciones del fabricante (*Sigma*) y 10  $\mu$ g DNasa, constituyendo la fracción nuclear. El sobrenadante resultante se centrifugó durante 60 minutos a 33.000 rpm y 4°C. El sobrenadante obtenido será la fracción citosólica. La metodología utilizada ha sido adaptada de la descrita previamente (Miguel *et al.*, 2001).

Las muestras pueden permanecer congeladas a -80°C hasta el momento de su uso.

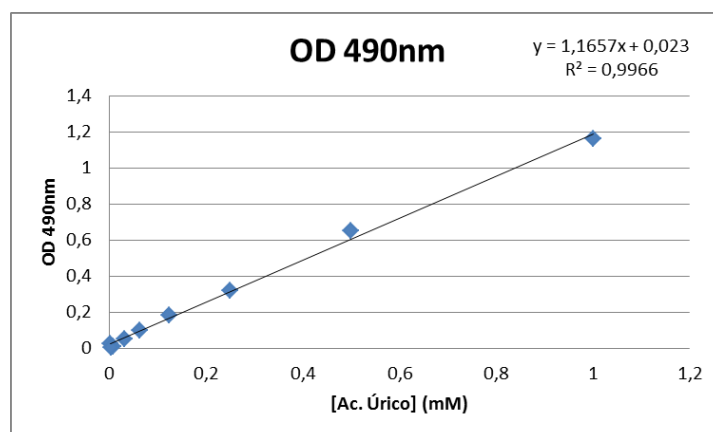
### 3.3.4. Extracción de proteínas insolubles para valorar TDP-43

Para analizar las alteraciones existentes en TDP-43, una vez terminadas las incubaciones de los cortes de cerebelo en Krebs, se pasaron los tubos a un recipiente con hielo, se eliminó todo el Krebs y se añadieron 0,5 ml de tampón *Low Salt* (tampón LS): Tris-HCl 50 mM, sacarosa 10%, EDTA 5 mM, añadiendo en el momento de su uso DTT 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasas según las indicaciones del fabricante (*Sigma*). Seguidamente, el tejido se homogenizó con un Potter Dounce de tipo B (50 pases) a 4°C, se centrifugó a 25.000 x g durante 30 minutos y a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en tampón Tritón X (5 ml/g de tejido): 1% Tritón X100 y 0,5 M de NaCl en tampón LS. A continuación, se centrifugó a 180.000 x g durante 30 minutos y a 4°C. Con el pellet resultante se llevó a cabo una desmielinización para lo cual se lavó con tampón Tritón X de nuevo, pero añadiéndole un 30% de sacarosa. Se volvió a centrifugar durante 30 minutos a 180.000 x g y a 4°C y el pellet resultante se resuspendió en tampón Sarcosil (5 ml/g de tejido): 1% de N-laurilsarcosina, 0,5 M de NaCl en tampón LS. Los tubos se incubaron a 22°C y en agitación durante 1 hora y seguidamente, se centrifugaron de nuevo a 180.000 x g, durante 30 minutos y a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 100 µl de tampón de urea: urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris-HCl 50 mM a pH 8,5. Por último, se volvió a centrifugar a 25.000 x g durante 30 minutos y a 22°C. El sobrenadante resultante constituye la fracción proteica insoluble, se alicuotaron 10 µl para valorar proteínas (punto 3.4.1), y el resto se guardó a -80 °C hasta el momento de su uso. Metodología adaptada en nuestro laboratorio de Sampathu *et al.* (2006) modificada por Leverenz *et al.*, 2007.

### 3.3.5. Medida de la capacidad antioxidante total

Los antioxidantes comúnmente neutralizan radicales mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, de sus siglas en inglés) o por transferencia de un único electrón (SET, de sus siglas en inglés). Un ensayo de SET cuantifica la capacidad de un antioxidante de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, como los radicales libres, los carbonilos y los metales. Hemos realizado el tratamiento de los cortes de cerebelo control (n=5) y tratados con L-BMAA 10 mM durante 2 horas y 45 minutos (n=5) para valorar la capacidad antioxidante total del tejido tras el tratamiento. La valoración se realizó utilizando un kit comercial (*OxiSelect<sup>TM</sup> Total Antioxidant Capacity*, *CellBiolabs*) que está basado en el mecanismo SET y se fundamenta en la

reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por antioxidantes como es el caso del ácido úrico, usado en este kit como estándar. Tras la reducción, el  $\text{Cu}^{+}$  reacciona uniendo un agente cromogénico que produce color, que puede ser valorado cuantificando su absorbancia máxima a una longitud de onda de 490 nm. Los valores obtenidos de absorbancia son proporcionales a la capacidad reductora total de las muestras (Figura 19). Los resultados serán mostrados como  $\mu\text{M}$  equivalentes reductores de cobre (CRE).



**Figura 19.** Recta patrón obtenida para concentraciones conocidas de ácido úrico.

Los valores de CRE para nuestras muestras son proporcionales a su capacidad antioxidante total.

### 3.4. PAGE-SDS y Western-Blot

#### 3.4.1. Valoración de proteínas

La valoración de la concentración de proteína de cada una de las fracciones subcelulares y de la fracción insoluble de proteínas, tanto en el caso de la obtención de las mismas a partir de células individualizadas como a partir de tejidos, se llevó a cabo según el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976), para lo cual utilizamos el reactivo de Bradford (*Sigma*).

#### 3.4.2. Electroforesis y Western-Blot

Las electroforesis para la separación de las proteínas presentes en las fracciones subcelulares y en las fracciones insolubles, tanto de tejidos como de células, se

realizaron por PAGE-SDS (gel electroforesis de poliacrilamida en presencia de SDS) que separa las proteínas en función de su peso molecular.

Los extractos proteicos se calentaron durante 5 min a 100 °C con tampón de ruptura 2X (tampón de Laemly) para la desnaturalización de las proteínas. En todos los casos, el gel concentrante contuvo un 6% de poliacrilamida (mezcla de acrilamida y bisacrilamida). En contraposición, el gel separador fue diferente según el peso molecular de la proteína que queramos separar. Así, para la cuantificación de GSK3 se utilizó un gel separador con una concentración de poliacrilamida del 10%, para TDP-43 se usó un gel en gradiente entre el 5 y el 15% y para la valoración del LC3B un porcentaje de poliacrilamida del 12%. Las electroforesis se llevaron a cabo a una intensidad constante de 40 mA/gel.

Los tampones empleados para llevar a cabo el Western-Blot fueron:

- *Running Buffer* 10x pH 8,3 (stock, guardar a 4 °C): Tris-Base 0,25 M, Glicina 1,92 M, y pH 8,3.
- Tampón de Electroforesis 1x: diluir el *Running Buffer* 10x en H<sub>2</sub>O milliQ y añadirle SDS al 0,1%.
- Tampón de Transferencia 1x: diluir el *Running Buffer* 10x en H<sub>2</sub>O milliQ y añadirle metanol al 20%.

Posteriormente, las proteínas de los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Amersham<sup>TM</sup> Hybond<sup>TM</sup> - ECL*) en sistema húmedo a 10V o/n y a 4°C. Tras la transferencia, las membranas se bloquearon durante una hora con leche en polvo al 4% en TTBS: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 137 mM y Tween-20 al 0,05%, con un 1% de BSA y se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C. A continuación, se lavaron las membranas tres veces durante 10 min con TTBS y se incubaron una hora y media con el anticuerpo secundario. Tras cuatro lavados de 10 min se detectaron las proteínas por quimioluminiscencia (ECL, *Amersham Biosciences*). Las imágenes fueron adquiridas mediante *Fujifilm Intelligent Darkbox II* (*Fuji System*) y el tratamiento de las imágenes para su densitometrado se llevó a cabo con el programa de procesado de imágenes de software libre *Image J*.

### 3.5. Anticuerpos y diluciones utilizadas

En función de la técnica y siguiendo las recomendaciones de las casas comerciales, se establecieron las condiciones para el uso de cada uno de ellos, quedando las diluciones y todos los datos técnicos resumidos en la Tabla 6.

Denominación del Ac	Proteína que reconoce	Tipo	Casa comercial	WB	IHQ MF	IHQ ME
Rabbit polyclonal anti GSK3 $\beta$ (Ab9)	GSK3 $\beta$	1°	Signalway Antibody	1:1000	1:100	--
Rabbit polyclonal anti GSK3 $\beta$ (phospho Ser9)	P-GSK3 $\beta$	1°	Signalway Antibody	1:1000	--	--
Rabbit polyclonal anti TARDBP	TDP43	1°	ProteinTech	1:1000	1:200	1:50
Mouse monoclonal anti phospho (409/410)-TDP43	P-TDP43	1°	ProteinTech	1:800	--	--
Rabbit polyclonal anti ubiquitin	Ubiquitina	1°	Novus Biologicals	1:5000	1:1000	--
Rabbit polyclonal anti tubulin $\beta$ -III	Tubulina	1°	Novus Biologicals	1:1000	1:200	--
Rabbit polyclonal anti LC3B	LC3B	1°	Novus Biologicals	--	1:400	--
Anti rabbit IgG-Fc fragment conjugated Dy Light 594	Anticuerpo 1° de conejo, color rojo	2°	Bethyl Laboratories	--	1:100	--
Anti rabbit IgG-Fc fragment conjugated Dy Light 488	Anticuerpo 1° de conejo, color verde	2°	Bethyl Laboratories	--	1:100	--
Donkey anti rabbit IgG-Fc Horseradish Peroxidase	Anticuerpo 1° hecho en conejo	2°	Thermo Scientific	1:2000	--	--
Donkey anti mouse IgG-Fc Horseradish Peroxidase	Anticuerpo 1° hecho en ratón	2°	Thermo Scientific	1:1000	--	--
Goat anti rabbit IgG-Fc + (oro coloidal de 10 nm)	Anticuerpo 1° hecho en conejo	2°	British Biocell	--	--	1:200

**Tabla 6.** Resumen de anticuerpos usados en las distintas técnicas manejadas. Se detalla la denominación de los anticuerpos (Ac), la proteína reconocida por cada uno de ellos, si se trata de un anticuerpo usado como anticuerpo primario o secundario, su casa comercial y la dilución para las tres técnicas de inmunodetección usadas (WB: western-blot, IHQ MF: inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia, IHQ ME: inmunohistoquímica para microscopía electrónica).

### 3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos han sido representados como la media  $\pm$  error estándar medio (SEM). La comparación entre resultados procedentes de controles y los procedentes de los distintos tratamientos se analizaron usando una t de Student en el caso de dos tratamientos y un ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni en el caso de más de dos tratamientos a comparar. Todo ello se llevó a cabo con el paquete informático GraphPad Prism v 5.03. Un p-valor  $\leq 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.



## **4. RESULTADOS**

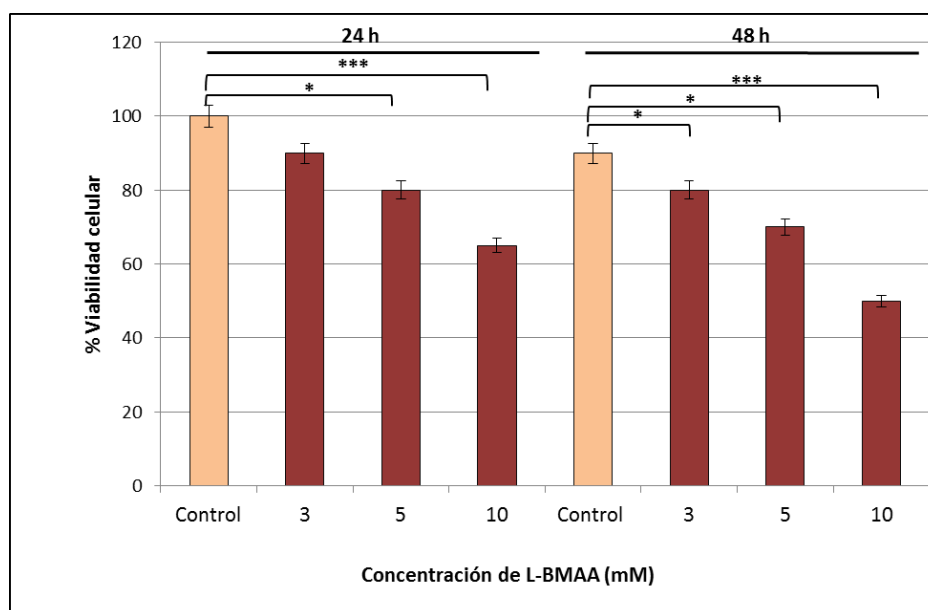




## 4.1. Estudio de la acción del L-BMAA sobre cultivos celulares de neuroblastoma SH-SY5Y

### 4.1.1. Viabilidad celular

Para valorar la acción del L-BMAA sobre la viabilidad celular, los cultivos de células SH-SY5Y fueron tratados con diferentes concentraciones del aminoácido durante diferentes tiempos de exposición al tóxico. Nuestros resultados indican que la acción del L-BMAA es dependiente de la dosis. El L-BMAA 10 mM produce una disminución de la viabilidad celular ensayada por MTT de un 32% ( $t = 8,573$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ). La muerte celular se incrementa a medida que aumenta el tiempo de exposición, resultando ser mayor tras 48 horas que tras 24 horas (Figura 20).

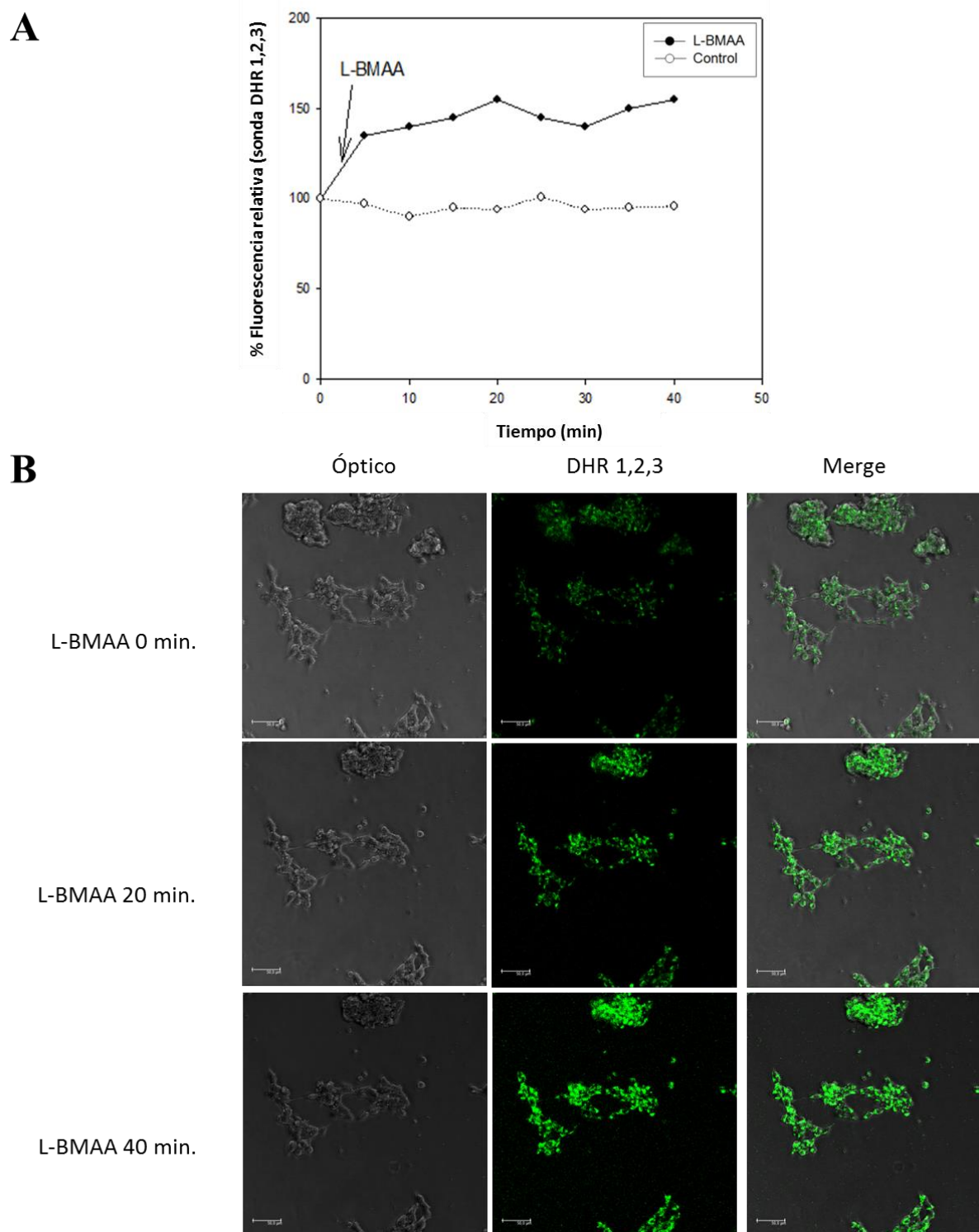


**Figura 20.** Efecto del L-BMAA a distintas concentraciones sobre la viabilidad celular de las células SH-SY5Y. Los datos son representados por la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Teniendo en cuenta estos resultados, para el resto de experimentos establecimos la dosis de 10 mM de L-BMAA y el tiempo de exposición al tóxico de 24 horas para que toda la muerte que estamos cuantificando se deba mayoritariamente al tóxico y no al agotamiento de nutrientes del medio causado por un cultivo más prolongado.

#### **4.1.2. Generación de ROS**

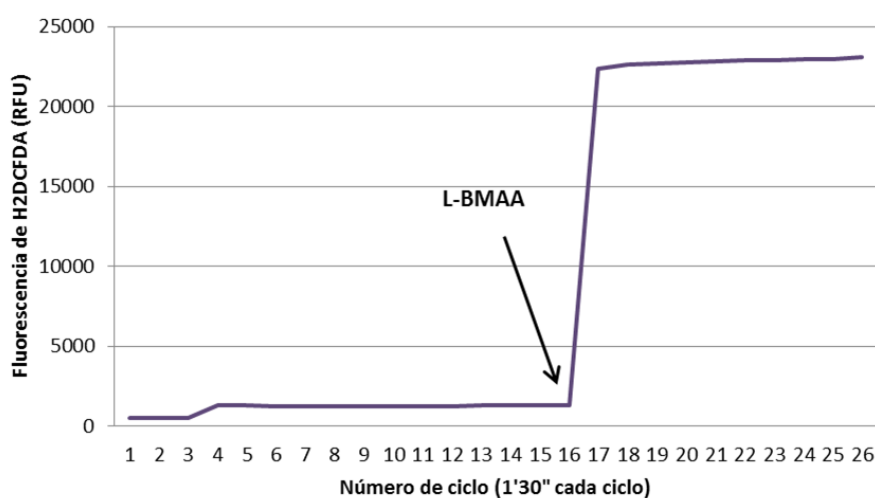
En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas ocurre un aumento de la formación de ROS (Wang J.Y. *et al.*, 2006). En nuestras condiciones experimentales, se pone de manifiesto la rápida y elevada producción de ROS que causa el L-BMAA 10 mM. Se alcanza un incremento cercano al 60% a los 20 minutos de añadir el aminoácido (Figura 21).



**Figura 21.** Efecto del L-BMAA en la generación de ROS. A) Las células fueron cargadas 30 minutos con DHR1,2,3 y analizadas por microscopía confocal. La primera imagen fue adquirida a tiempo 0 marcando el 100% de fluorescencia, inmediatamente después de la primera foto se añadió el L-BMAA. Los datos representados se corresponden con la fluorescencia relativa normalizada de al menos 60 células con respecto al punto inicial del

experimento. B) Imágenes de microscopía confocal sin filtro de fluorescencia (óptico), las imágenes de fluorescencia de la sonda utilizada (DHR 1,2,3) y la mezcla de las dos imágenes (Merge) justo antes de añadir el L-BMAA, a los 20 minutos de la presencia del L-BMAA en el medio y a los 40 minutos, que es el punto final del experimento. La barra de escala equivale a 50  $\mu\text{m}$ .

Adicionalmente, para afianzar el resultado anterior, se valoró la producción de estas especies reactivas de oxígeno con otra sonda, el H<sub>2</sub>DCFDA. En el momento de aplicación del L-BMAA 10 mM se observa un incremento inmediato de la producción de especies reactivas de oxígeno, tal y como se observa en la Figura 22.

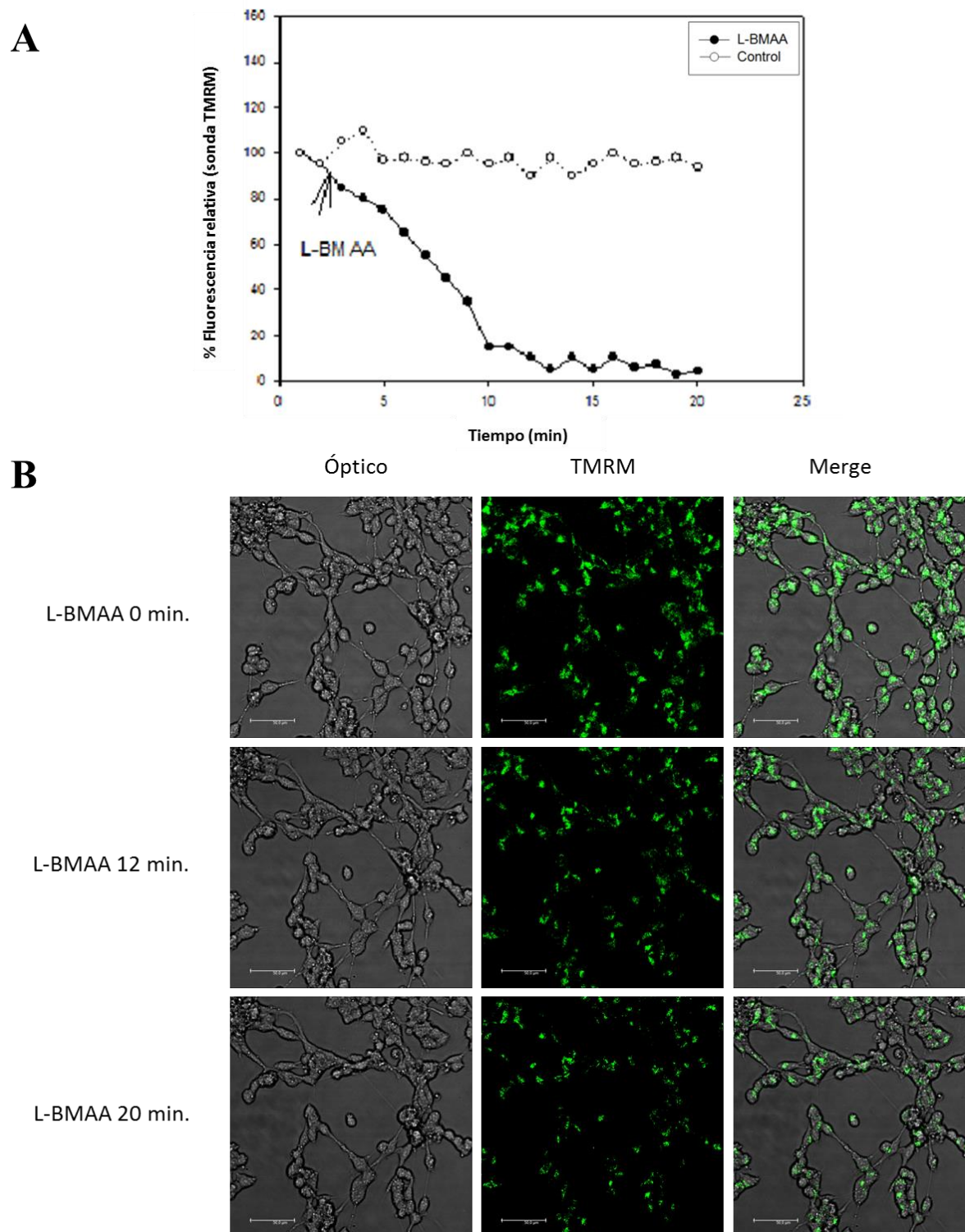


**Figura 22.** Representación gráfica de las 26 medidas (denominadas ciclos) de fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA tomadas con un intervalo de tiempo cada una de 1 minuto 30 segundos con respecto a la medida anterior. Inicialmente se dejan pasar unos cuantos ciclos para que se estabilice la fluorescencia de la sonda. La adición del L-BMAA 10 mM se realiza en el ciclo 16 (flecha). RFU: unidades de fluorescencia relativas.

#### 4.1.3. Despolarización de la membrana mitocondrial

En muchas enfermedades neurodegenerativas se ha visto una afectación mitocondrial severa, que afecta principalmente a la cadena de transporte electrónico. El potencial de membrana mitocondrial es creado principalmente por esta cadena de transporte de electrones, y sus cambios han sido relacionados con la muerte neuronal (Iijima, 2006; Martin, 2012). Por ello, hemos considerado importante valorar los posibles cambios en el potencial de membrana mitocondrial causados por la exposición al L-BMAA 10 mM.

Nuestros resultados ponen de manifiesto que en las células tratadas con el agente neurotóxico se produce una rápida despolarización de la membrana mitocondrial de manera tiempo dependiente (Figura 23).



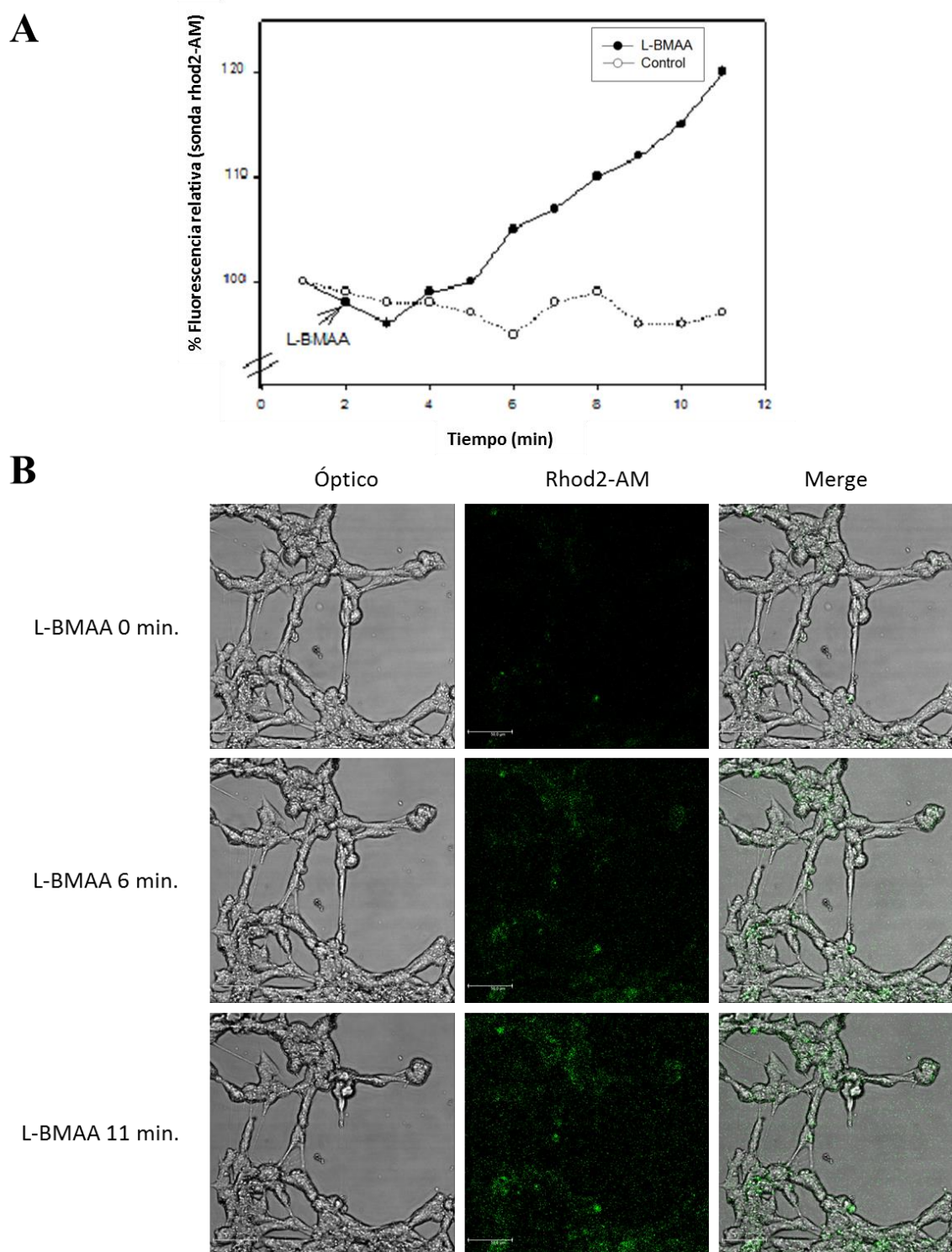
**Figura 23.** Efecto del L-BMAA 10 mM sobre la despolarización de la membrana mitocondrial medida con la sonda TMRM. A) La flecha indica la adición del tóxico. Los datos representados

*corresponden a la fluorescencia relativa normalizada de al menos 60 células con respecto al punto inicial del experimento. B) Imágenes representativas de microscopía confocal sin filtro de fluorescencia (óptico), las imágenes de fluorescencia de la sonda utilizada (TMRM) y la mezcla de las dos imágenes (Merge) justo antes de añadir el L-BMAA, a los 12 minutos de la presencia del L-BMAA en el medio y a los 20 minutos, que es el punto final del experimento. La barra de escala equivale a 50  $\mu\text{m}$ .*

#### **4.1.4. Análisis del calcio mitocondrial**

Teniendo en cuenta que el L-BMAA 10 mM causa una despolarización de membrana mitocondrial importante, y dado que esta alteración afecta a su permeabilidad, consideramos interesante la valoración del calcio liberado por las mitocondrias. Tal y como cabía esperar, el tratamiento con L-BMAA produce un aumento de la liberación de calcio procedente de las mitocondrias (Figura 24).





**Figura 24.** Efecto del L-BMAA 10 mM sobre la liberación de calcio mitocondrial medida con la sonda rhod2-AM. A) La flecha indica la adición del tóxico. Las imágenes fueron adquiridas cada 60 segundos. Los datos representados corresponden a la fluorescencia relativa normalizada de al menos 60 células con respecto al punto inicial del experimento. B) Imágenes representativas de microscopía confocal sin filtro de fluorescencia (óptico), las imágenes de



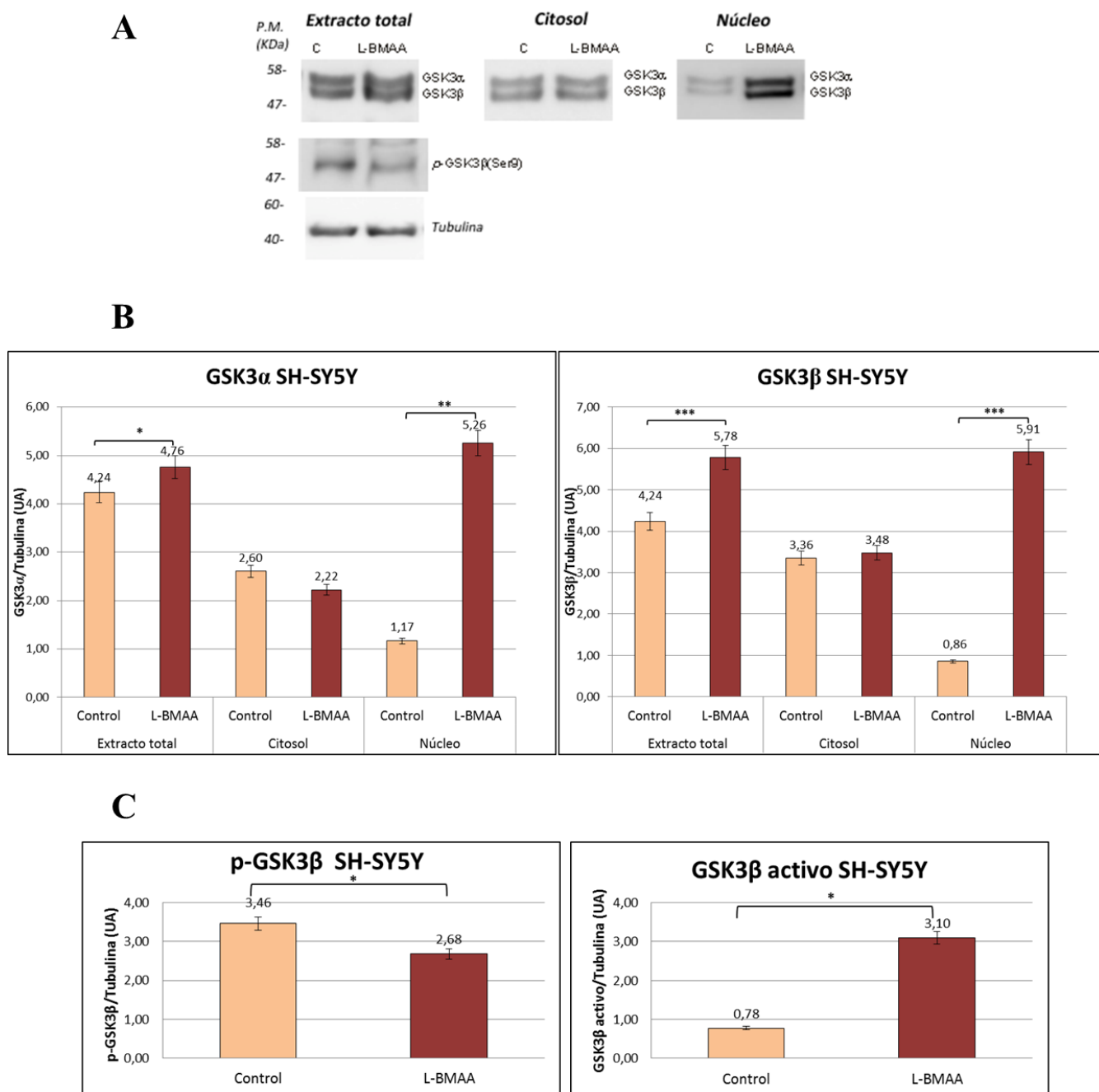
*fluorescencia de la sonda utilizada (rhod2-AM) y la mezcla de las dos imágenes (Merge) justo antes de añadir el L-BMAA, a los 6 minutos de la presencia del L-BMAA en el medio y a los 11 minutos, que es el punto final del experimento. La barra de escala equivale a 50  $\mu$ m.*

#### **4.1.5. Análisis de GSK3**

Teniendo en cuenta el importante papel de GSK3 $\beta$  en las enfermedades neurodegenerativas (Yang W. *et al.*, 2008), analizamos los niveles y la distribución subcelular de la enzima en las células SH-SY5Y tras el tratamiento con L-BMAA 10 mM.

Los resultados muestran un incremento de los niveles totales de GSK3 $\beta$  ( $F = 10,50$ ;  $p$ -valor = 0,0005) acompañados de una disminución de los niveles de p(Ser9)-GSK3 $\beta$  en los extractos totales ( $t = 2,60$ ;  $p$ -valor < 0,05). Cuando se analizó la fracción nuclear, se observó un incremento de GSK3 $\beta$  ( $t = 6,197$ ;  $p$ -valor < 0,001), sin observarse ningún cambio en sus niveles citosólicos. También se observa un incremento de los niveles de GSK3 $\alpha$  producido por la exposición al L-BMAA ( $F = 7,810$ ;  $p$ -valor = 0,0018), tal y como se observa en la Figura 25. Aunque en los últimos años la isoforma de GSK3 que ha sido más relacionada con desórdenes neurodegenerativos ha sido GSK3 $\beta$ , para GSK3 $\alpha$  también se ha descrito que puede llegar a tener un papel importante en procesos neuropatológicos como ELA y Alzheimer (Chung *et al.*, 2008; Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011).

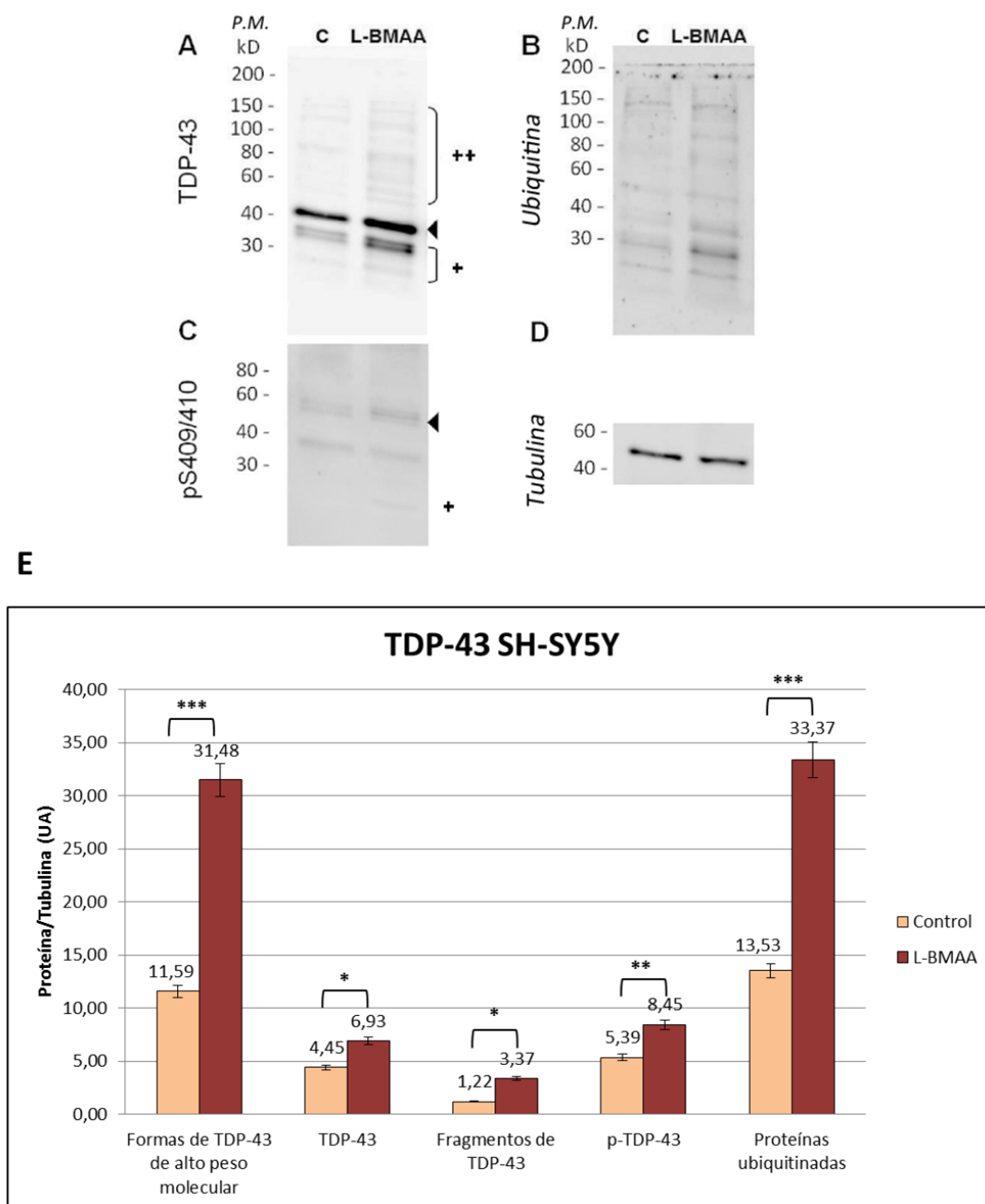
Una vez obtenidos los valores de la cuantificación de GSK3 $\beta$  y de GSK3 $\beta$  fosforilado (P-GSK3 $\beta$ ), se procedió a extrapolar de estos valores la fracción activa de GSK3 $\beta$ , obteniéndose un incremento significativo de la fracción activa de esta enzima en las células tratadas con L-BMAA 10 mM, con respecto a las células control ( $t = 2,904$ ;  $p$ -valor = 0,0440). Por tanto, se puede concluir que tal y como cabía esperar, el L-BMAA causa un incremento de la actividad de GSK3 $\beta$  en las células SH-SY5Y a las 24 horas de exposición al tóxico.



**Figura 25.** Efecto del L-BMAA sobre GSK3 $\alpha$  y  $\beta$  en células SH-SY5Y. A) Se muestra una imagen representativa de un western blot de células control y células tratadas con L-BMAA 10 mM durante 24 horas. Se analizaron los extractos totales, los citosoles y la fracción nuclear. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$  en cada una de las fracciones subcelulares. C) Representación del resultado obtenido para P-GSK3 $\beta$  y mediante cálculo matemático extrapolación para cuantificar el incremento de la fracción activa de GSK3 $\beta$  en las células tratadas con L-BMAA. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). UA: unidades arbitrarias.

#### 4.1.6. Análisis de TDP-43

Para determinar si el tratamiento con L-BMAA conduce a formas alteradas de TDP-43, tal y como aparece frecuentemente en desordenes neurodegenerativos, analizamos la presencia de agregados de esta proteína, la generación de formas de TDP-43 de alto peso molecular y las formas fosforiladas y truncadas de TDP-43 (Figura 26).



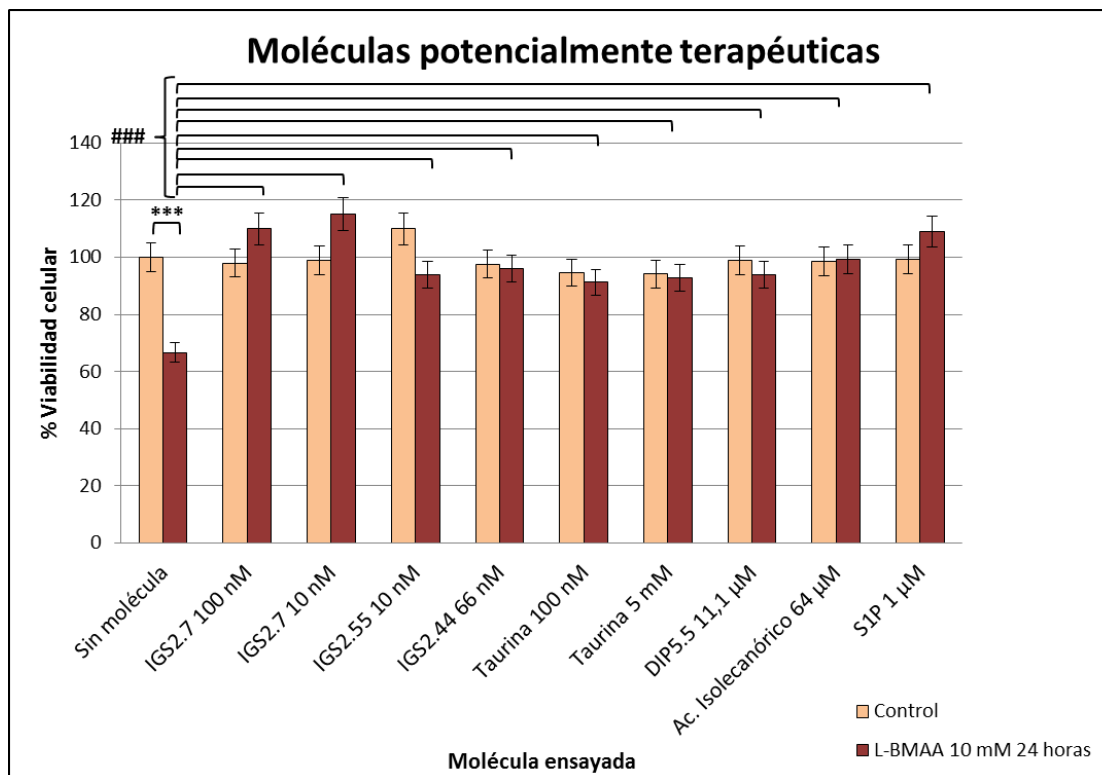
**Figura 26.** Western blots representativos de la fracción proteica insoluble obtenida de las células SH-SY5Y control y tratadas con L-BMAA 10 mM durante 24 horas. A) Análisis de las diferentes especies de TDP-43, incluyendo bandas de bajo peso molecular correspondientes a

*fragmentos truncados de TDP-43 (+) y bandas de alto peso molecular de TDP-43 (++). B) Proteínas ubiquitinizadas correspondientes al mismo gel. C) Niveles de P-TDP-43(S409/410) del mismo gel. D) Western blot de tubulina como control de carga del western blot. E) Análisis cuantitativo de las formas de TDP-43 de alto peso molecular, de TDP-43 normal, de los fragmentos de TDP-43, de su forma fosforilada y de la presencia de proteínas ubiquitinizadas. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). AU: unidades arbitrarias.*

Estos datos indican que la adición de L-BMAA 10 mM durante 24 horas causan un incremento del TDP-43 insoluble ( $t = 3,073$ ;  $p$ -valor = 0,0385), así como de su forma fosforilada (TDP-43 p-(S409/410)) ( $t = 3,748$ ;  $p$ -valor = 0,002). También se observa la aparición de formas de TDP-43 de alto peso molecular ( $t = 24,36$ ;  $p$ -valor < 0,0001) y la aparición de fragmentos insolubles de TDP-43 de 25 y 35 KDa ( $t = 3,033$ ;  $p$ -valor = 0,0480). Además, los resultados también muestran que la adición de L-BMAA causa un alto grado de ubiquitinización en las proteínas ( $t = 24,30$ ;  $p$ -valor < 0,0001).

#### **4.1.7. Estudios de neuroprotección**

Para valorar si el efecto producido por el L-BMAA 10 mM en las células SH-SY5Y podía revertirse de alguna manera se ensayaron distintas moléculas que potencialmente podrían restaurar el daño causado por este aminoácido excitotóxico. Se realizaron ajustes de las dosis para que las moléculas no produjeran una disminución de la viabilidad de las células SH-SY5Y por sí solas, y a continuación las moléculas seleccionadas se ensayaron junto con el tratamiento con L-BMAA. Los potenciales protectores utilizados fueron inhibidores de GSK3 (IGS 2.7; IGS 2.55; IGS 2.44; Ac. isolecanórico), inhibidores de CK-1 $\delta$  (DIP 5.5), taurina y S1P.



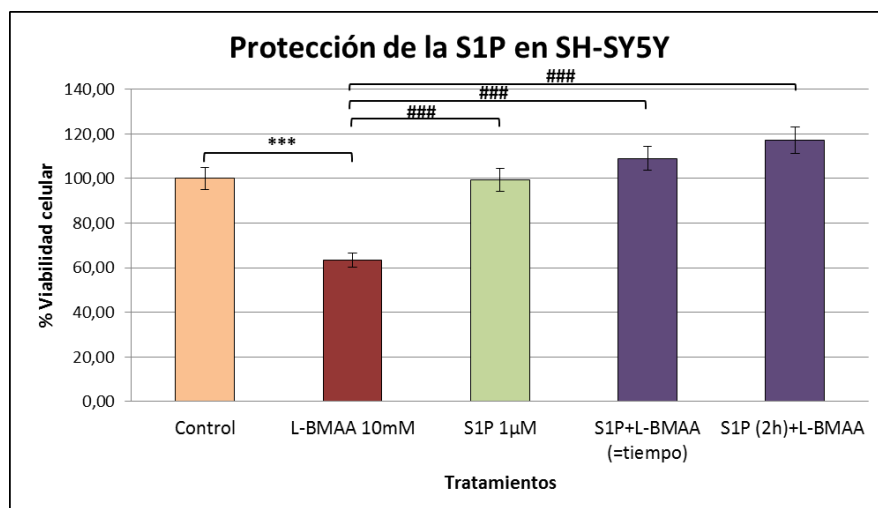
**Figura 27.** Se representa el porcentaje de viabilidad de las células SH-SY5Y obtenido con respecto al control, que representa el 100% de viabilidad. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo).

Las dosis utilizadas en el presente estudio para las distintas moléculas son valores cercanos a las IC50 que dichos compuestos muestran frente a caseína quinasa (ver material y métodos, punto 3.1.3). Se observa que el tratamiento con el IGS2.7 a una concentración de 100 y 10 nM, con el IGS2.55 10 nM, con la taurina a 100 nM y a 5 mM, con el DIP5.5 11,1  $\mu$ M y con el ácido isolecanónico 64  $\mu$ M evitan la muerte que causa el L-BMAA en las células, ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento con estos inhibidores + L-BMAA y el control (Figura 27). Lo mismo ocurre con la esfingosina-1-fosfato (S1P) 1  $\mu$ M.

#### 4.1.8. S1P como neuroprotector

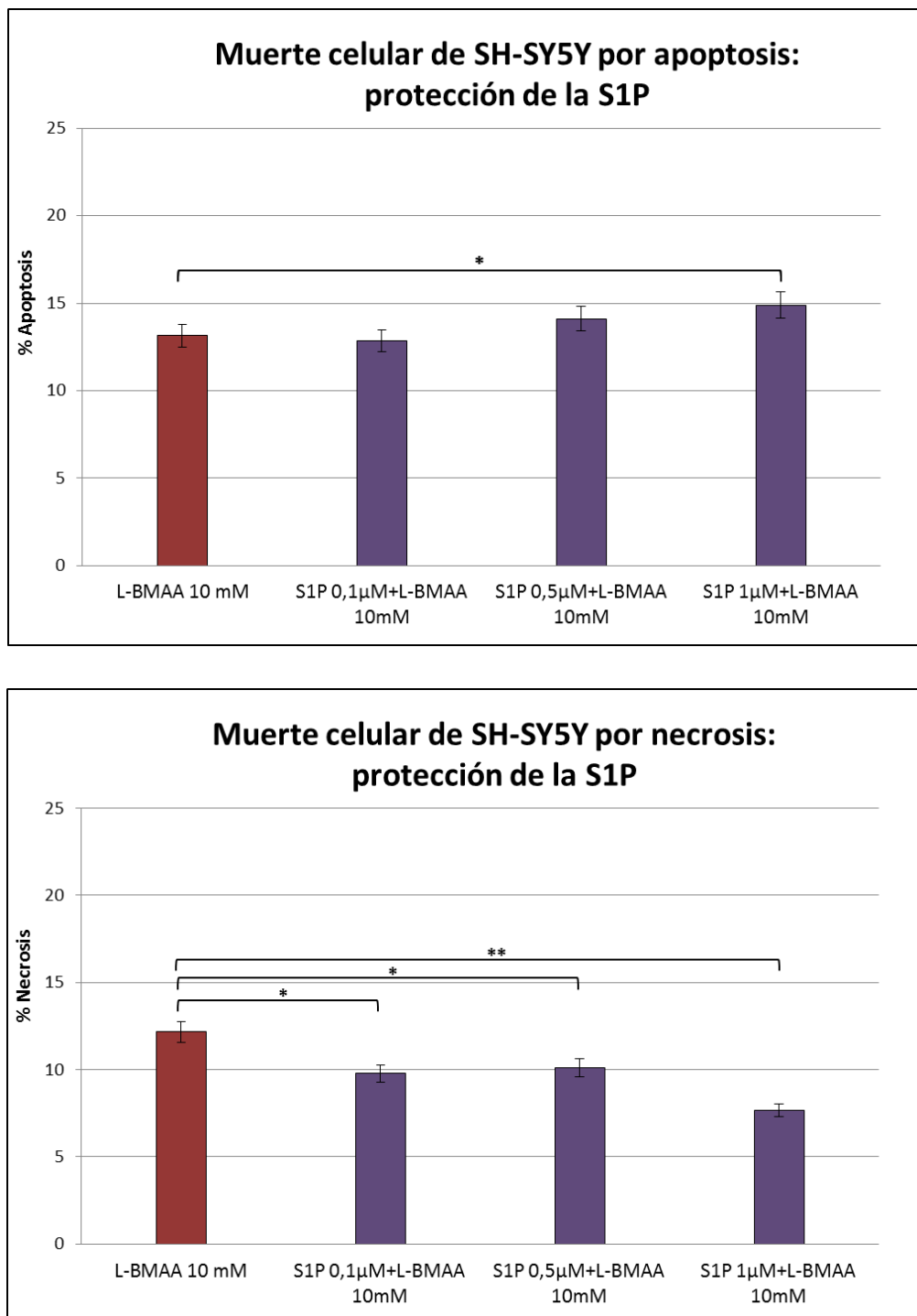
Realizamos un estudio más profundo del papel de la S1P, ya que los esfingolípidos y el papel neuroprotector de la S1P han constituido un tema de estudio de relevante interés en nuestro laboratorio (Agudo-López *et al.*, 2010b).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la S1P, protege de la muerte celular causada por 24 h de tratamiento con L-BMAA tanto si se aplica al mismo tiempo como si se aplica 2 horas antes de la exposición al tóxico (Figura 28).



**Figura 28.** Efecto de la S1P sobre la acción del L-BMAA en la viabilidad celular en las células SH-SY5Y. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo).

La muerte celular puede ocurrir por apoptosis o necrosis. Con el fin de dilucidar el tipo de muerte originada por el tratamiento con L-BMAA y de qué tipo de muerte protege la S1P, se realizaron experimentos de citometría de flujo ensayando diferentes dosis de S1P.

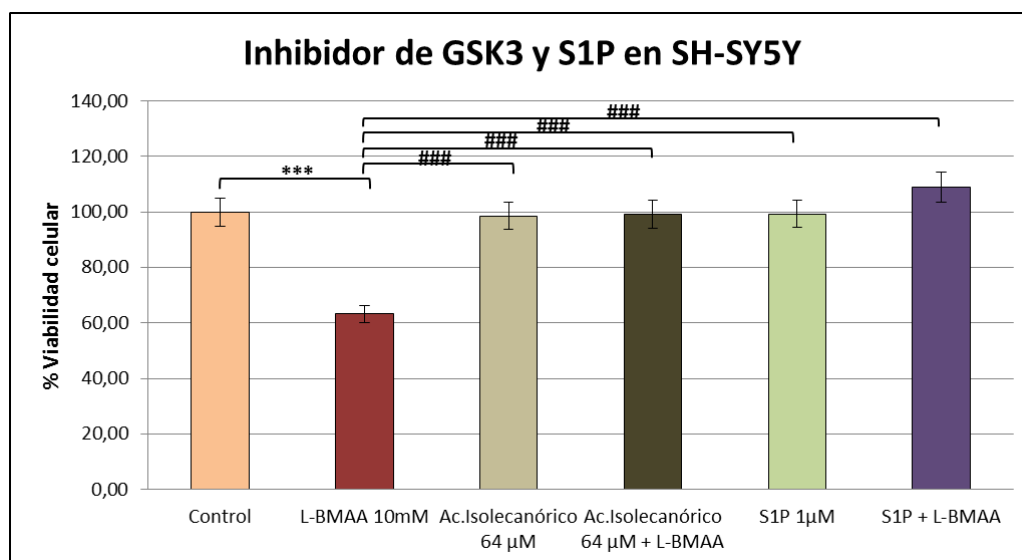


**Figura 29.** Porcentaje de muerte celular por apoptosis y por necrosis causadas por L-BMAA, acción de la S1P sobre ambos tipos de muerte. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

En la Figura 29, se indica que el tratamiento con L-BMAA 10 mM durante 24 horas, causa un nivel similar de muerte celular por apoptosis y por necrosis. Al aplicar la S1P se observa que, a las distintas dosis ensayadas, este esfingolípido da lugar a un descenso

significativo de la muerte celular causada por necrosis concomitante con un incremento de la apoptosis. A todas las dosis ensayadas la S1P protege de la necrosis causada por L-BMAA, sin embargo sólo es significativa la protección de la apoptosis cuando se utiliza el esfingolípido 1  $\mu\text{M}$  ( $F = 42,79$ ;  $p\text{-valor} < 0,0001$ ; para la apoptosis  $t = 4,143$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$  y para la necrosis  $t = 5,511$ ;  $p\text{-valor} < 0,01$ ).

Se realizó un estudio de viabilidad celular con un inhibidor de GSK3, el ácido isolecanórico y con la S1P (Figura 30). Los valores de  $\text{IC}_{50}$  del ácido isolecanórico son 1,2  $\mu\text{M}$  y 12  $\mu\text{M}$ , para GSK-3  $\beta$  y para CK-1  $\delta$ , respectivamente. Se observa que al tratar las células con L-BMAA e incubarlas tanto con el inhibidor como con la S1P se disminuye significativamente la muerte celular provocada por el L-BMAA ( $F = 70,60$ ;  $p\text{-valor} < 0,001$ ).

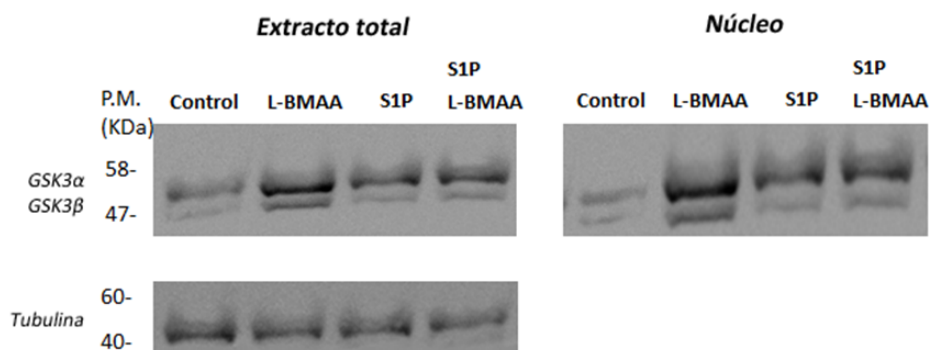


**Figura 30.** Efecto del inhibidor de GSK3, ácido isolecanórico y de la S1P sobre la acción del L-BMAA en la viabilidad celular en las células SH-SY5Y. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo).

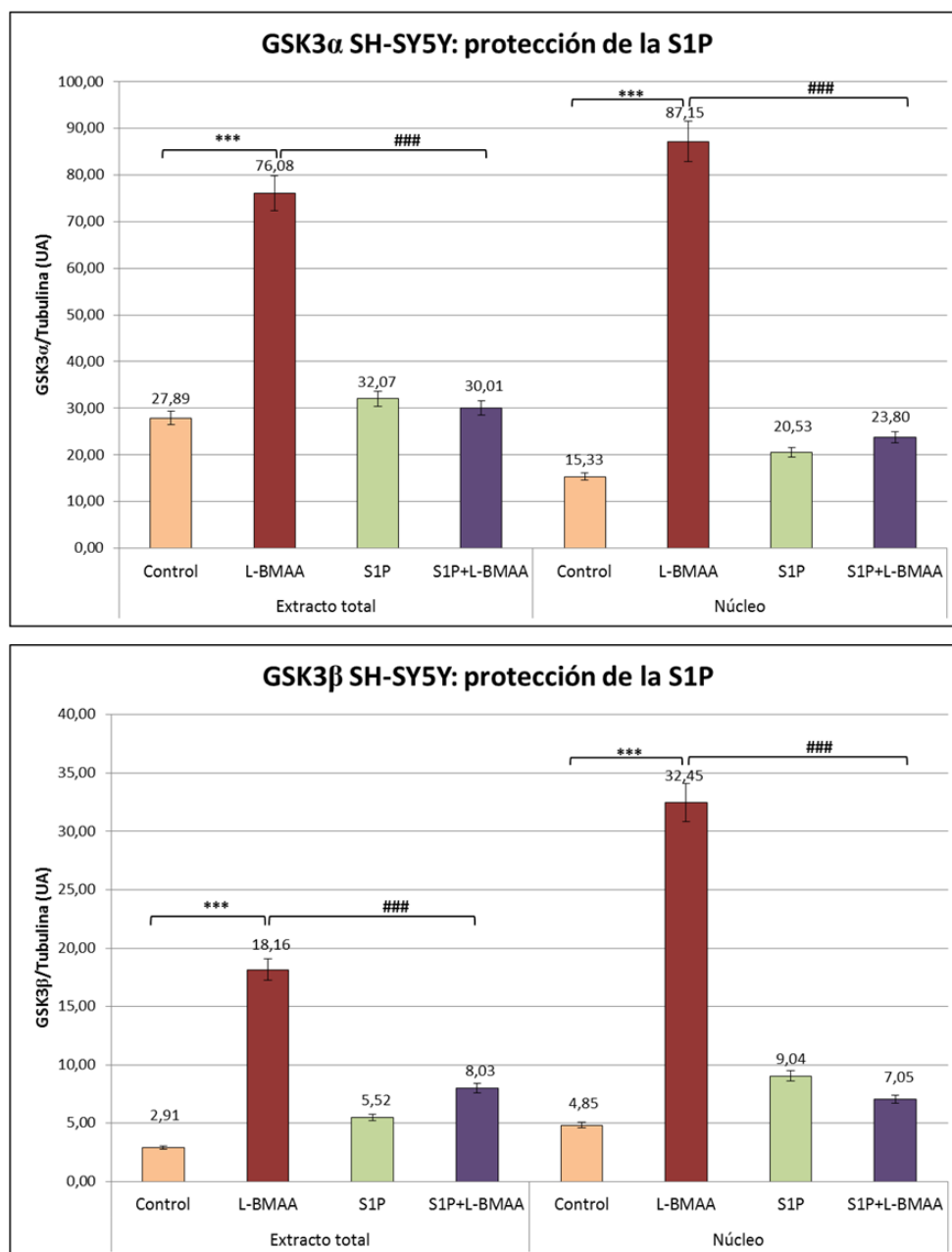
Para profundizar en el mecanismo de protección de la S1P y teniendo en cuenta el incremento que se observa en GSK3 $\beta$  en extracto total y en núcleo de las células SH-SY5Y tratadas con L-BMAA, procedemos a analizar en estas fracciones subcelulares las variaciones de GSK3 $\beta$  en presencia de S1P (Figura 31).



**A**



**B**



**Figura 31.** Efecto del L-BMAA y protección por S1P sobre GSK3α y GSK3β en extracto total y fracción nuclear de células SH-SY5Y. A) Se muestra una imagen representativa de un western

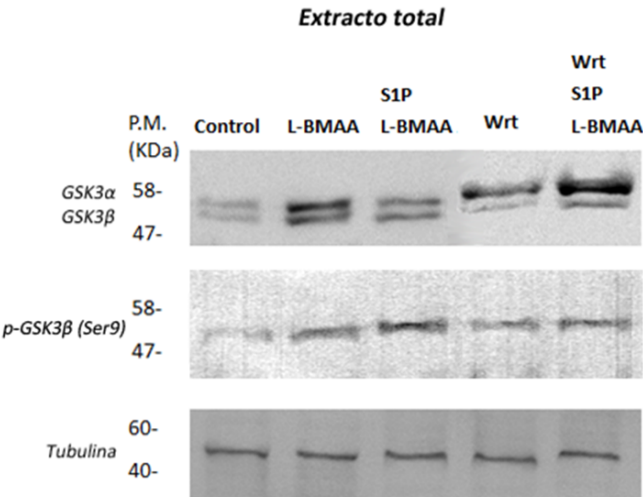
*blot de células control, células tratadas con L-BMAA 10 mM, células tratadas con S1P 1  $\mu$ M, y células con doble tratamiento, S1P y L-BMAA, durante 24 horas. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$  en las dos fracciones subcelulares. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo). UA: unidades arbitrarias.*

Nuestros resultados muestran que en extracto total y en la fracción nuclear de las células SH-SY5Y, la S1P 1  $\mu$ M es capaz de proteger de la subida (en un 55,79%) de GSK3 $\beta$  provocada por la exposición de 24 horas a L-BMAA 10 mM (en extracto total  $t = 12,41$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$  y en núcleos  $t = 31,11$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ). Este aumento de GSK3 $\beta$  está íntimamente relacionado con procesos de muerte celular (Joje y Johnson, 2004). Por otra parte, la protección ejercida por el esfingolípido sobre el incremento de GSK3 $\alpha$  es de un 60,55% (en extracto total  $t = 56,42$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$  y en núcleos  $t = 77,59$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ).

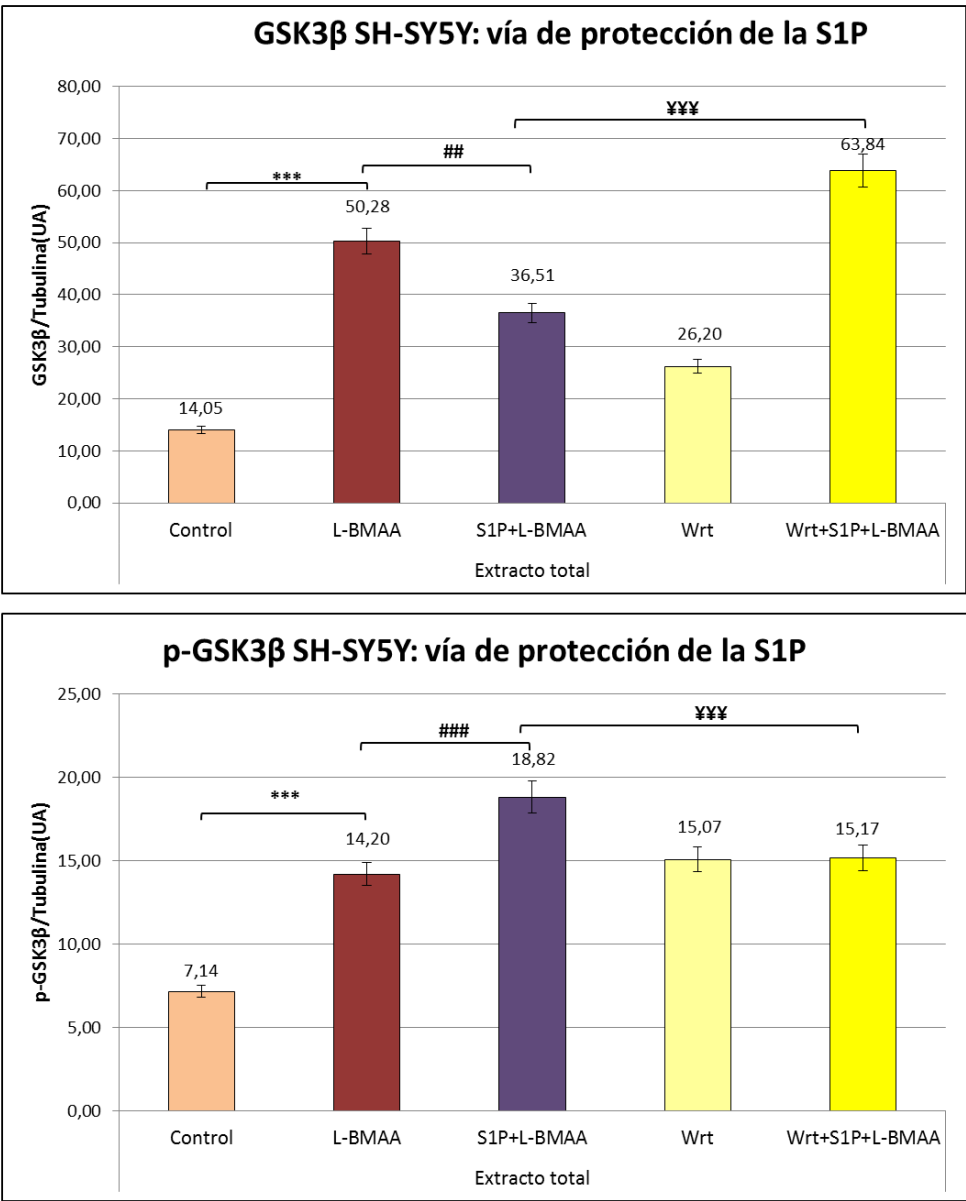
Para evaluar a través de qué vía de señalización protege la S1P del aumento de GSK3 $\beta$  causado por el L-BMAA 10 mM en las células SH-SY5Y, procedimos a analizar la principal vía de supervivencia que es la mediada por PI3K/Akt (PI3K es inhibida por la wortmanina, Wrt), en el extracto total (Figura 32).

Al valorar GSK3 $\beta$  se han obtenido diferencias significativas al comparar los tratamientos de S1P+L-BMAA con Wrt+S1P+L-BMAA ( $t = 114,2$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ). Cuando hemos valorado la forma inactiva de GSK3 $\beta$ , P-GSK3 $\beta$  (Ser 9), también hemos obtenido diferencias significativas al comparar los tratamientos de S1P+L-BMAA con Wrt+S1P+L-BMAA ( $t = 8,839$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ), en cambio no hemos hallado diferencias significativas para P-GSK3 $\beta$  comparando el tratamiento con L-BMAA junto con el de Wrt y tampoco hay diferencias significativas al comparar L-BMAA con Wrt+S1P+L-BMAA ( $F = 2,938$ ;  $p$ -valor  $> 0,05$ ).

A



B

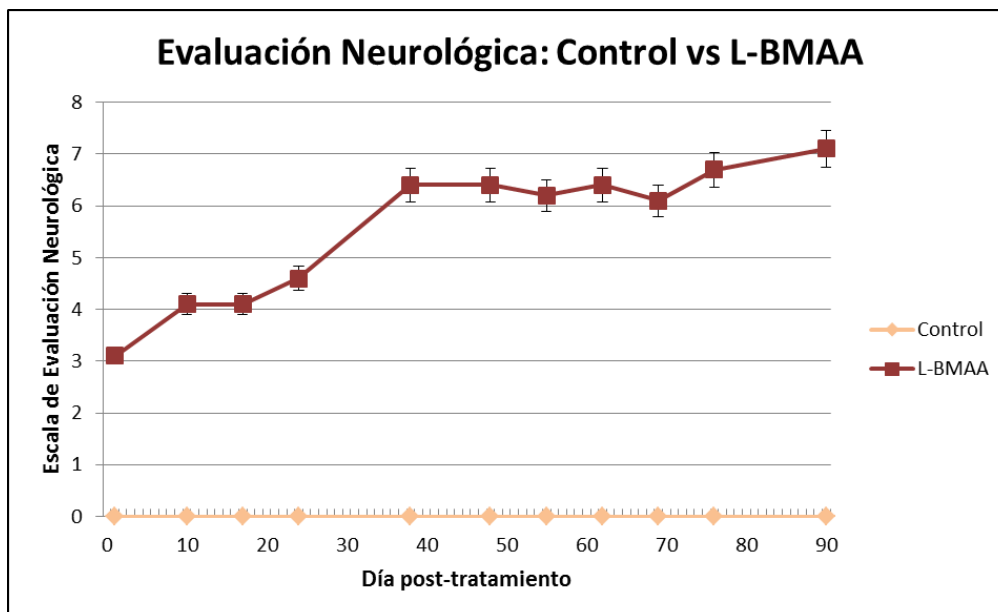


**Figura 32.** Acción del L-BMAA y la SIP en presencia o ausencia de romanina sobre GSK3 $\beta$  y P-GSK3 $\beta$  en extracto total de células SH-SY5Y.-A) Imagen representativa de un western blot de células control, células tratadas con L-BMAA 10 mM, células tratadas con L-BMAA y SIP 1  $\mu$ M, células tratadas con Wrt, células tratadas con Wrt+L-BMAA+SIP durante 24 horas. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3 $\beta$  y p- GSK3 $\beta$  en extracto total. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo, ¥  $p \leq 0,05$ ; ¥¥  $p < 0,01$ ; ¥¥¥  $p < 0,001$  comparando con respecto al tratamiento con SIP+L-BMAA). UA: unidades arbitrarias.

#### 4.2. Estudio de la acción del L-BMAA *in vivo*. Alteraciones en el cerebelo

Se realizó un control ponderal de los animales tratados con respecto a los controles para saber si el tratamiento afectaba al desarrollo normal del animal, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre controles y tratados (datos no mostrados).

En la evaluación neurológica EN de estos animales se observa una deambulación lateralizada, y en algunos casos los animales tratados tienen problemas para corregir su postura durante los giros en la marcha. Además, se aprecia un impedimento importante para mantener la postura en T durante el test de suspensión por la cola manteniendo las patas relajadas (no muestran tensión nerviosa) y echadas hacia la parte ventral, y en el test de fuerza las ratas tratadas apenas ejercen fuerza para seguir su sentido de la marcha y de despatarran, sobresaliendo las patas traseras de la proyección vertical de su cuerpo sobre la mesa (de Munck *et al.*, 2013b).



**Figura 33.** Representación gráfica obtenida para la escala de evaluación neurológica establecida por de Munck et al., 2013b. Se representan los animales control ( $n=20$ ), cuya evaluación neurológica es de 0 a lo largo de todo el periodo de observación, y la media  $\pm$  el error estándar obtenido para los animales tratados con 300 mg/Kg/día de L-BMAA durante 5 días de tratamiento ( $n = 20$ ). En el eje de abscisas se representan los días post-tratamiento en los cuales se evaluó a los animales.

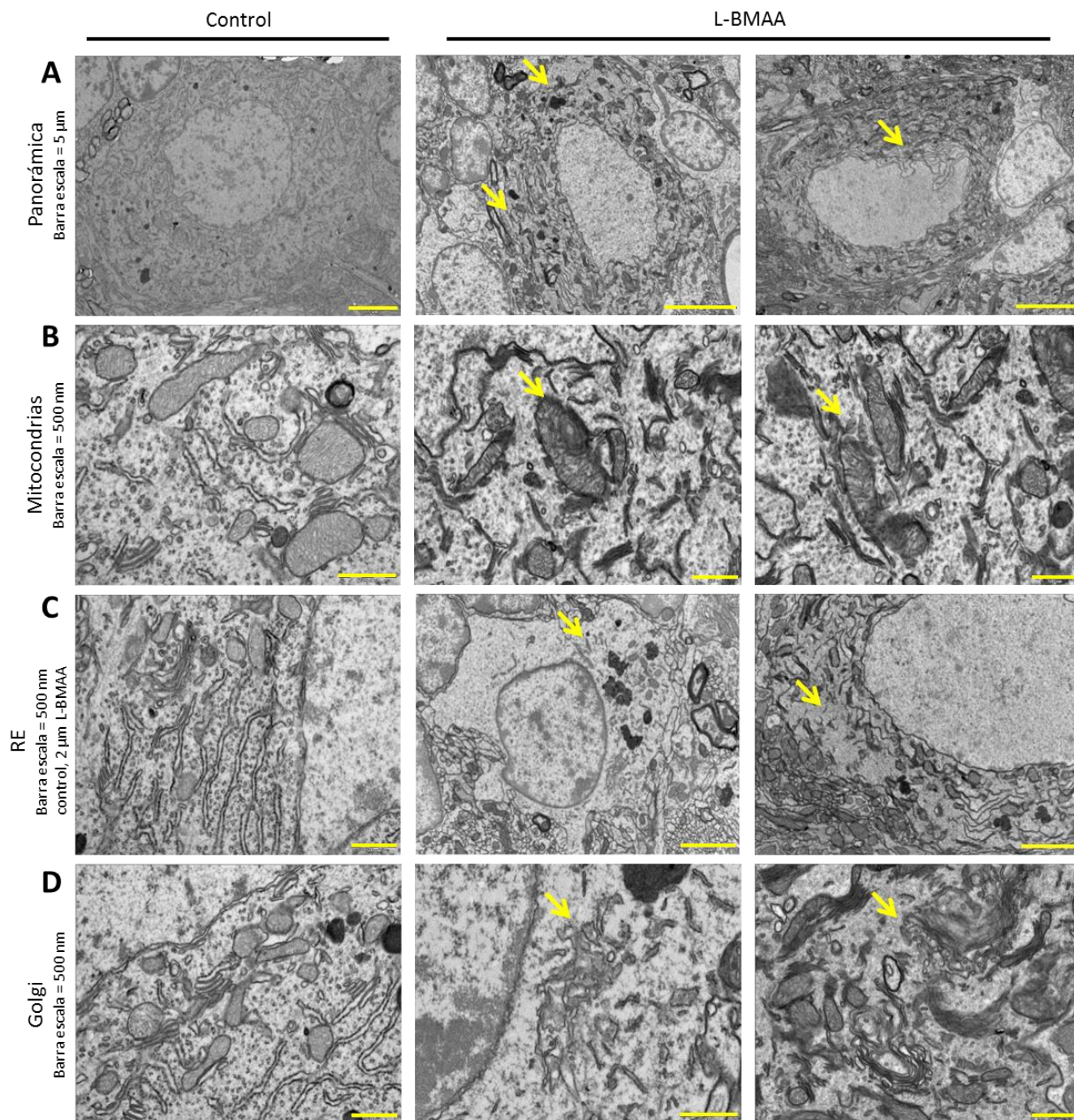
Se observa que a los 90 días post-tratamiento, los animales tratados alcanzan una evaluación neurológica de 7 (Figura 33). Este es el momento en el que los animales fueron sacrificados para llevar a cabo el resto de ensayos. En todos los puntos de evaluación neurológica se observan diferencias significativas entre los animales control y los tratados ( $t = 12,83$ ;  $p\text{-valor} < 0,0001$ ).

Dada la implicación del cerebelo sobre el control postural como centro integrador del movimiento, consideramos importante evaluar las alteraciones cerebelares, tanto bioquímicas como morfológicas, que pueden ser las causantes de esta evaluación neurológica elevada.

#### 4.2.1. Alteraciones ultraestructurales

Dado que el L-BMAA produce alteraciones en los flujos de calcio y genera estrés oxidativo, nos ha parecido importante estudiar su efecto sobre la ultraestructura celular, ya que la integridad de los orgánulos se puede ver alterada como consecuencia de ésta excitotoxicidad. Esta serie de anomalías celulares pueden afectar a las

mitocondrias, produciéndose una disfunción mitocondrial severa (Martin, 2012). Además de las mitocondrias, y como consecuencia del incremento intracelular de los niveles de especies reactivas de oxígeno, se produce también estrés del retículo endoplásmico, y alteraciones relacionadas con el transporte vesicular que afectan también al AG (Nassif *et al.*, 2010). Por ello, nos pareció interesante valorar mediante microscopía electrónica convencional el estado ultraestructural de las neuronas de Purkinje del cerebelo de los animales tratados con L-BMAA con respecto al estado de esas mismas células en los animales control.



**Figura 34.** Figura representativa de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica convencional para visualizar la ultraestructura de neuronas de Purkinje en el cerebelo de animales control ( $n = 3$ , primera columna) y de animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ , segunda y tercera columna). Las flechas amarillas en todas las imágenes señalan las diferencias más significativas entre las neuronas de Purkinje de los cerebelos de animales tratados con L-BMAA con respecto a las fotografías obtenidas para los animales control.



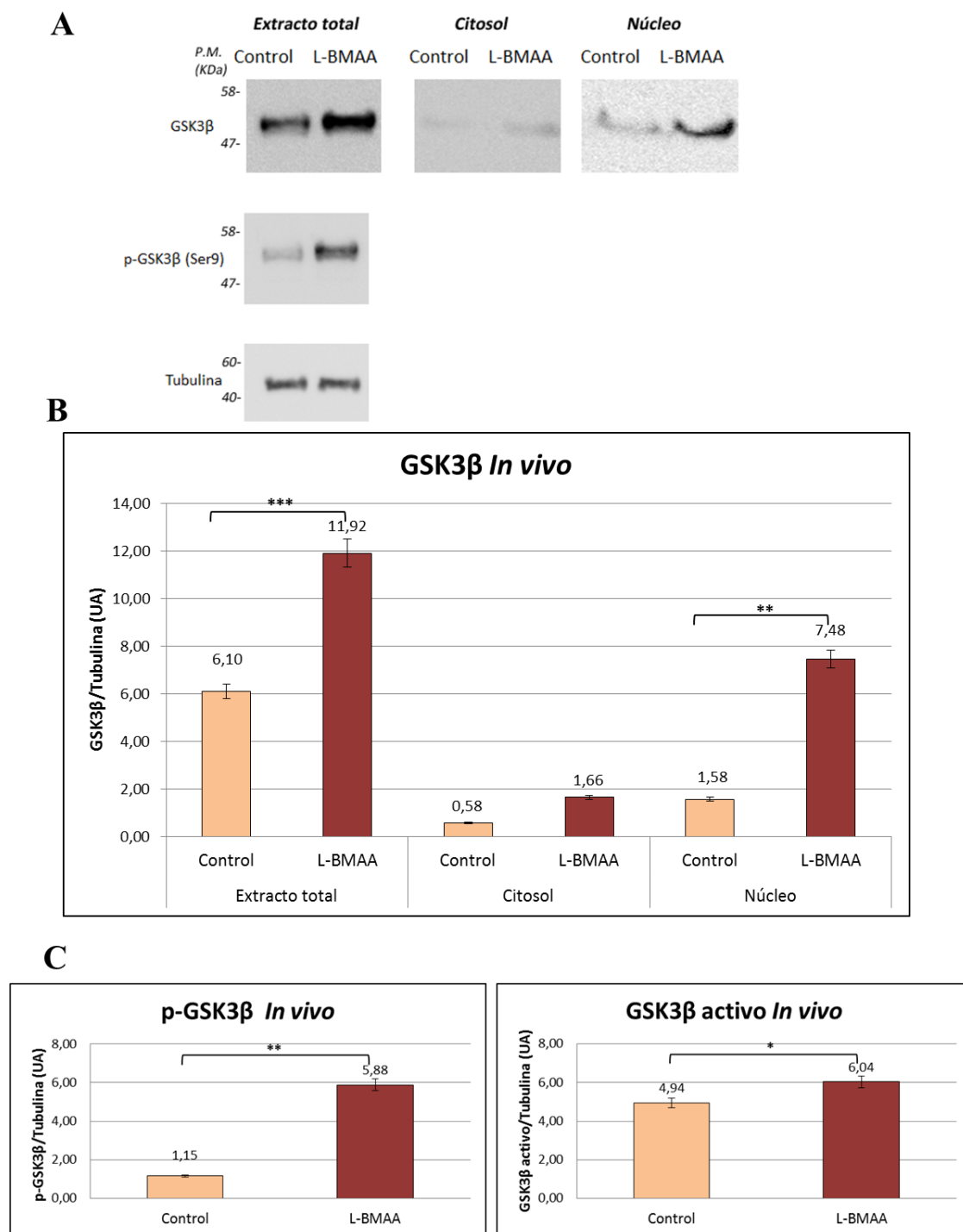
En la Figura 34, podemos observar en la imagen panorámica (A) de las células de Purkinje correspondientes a cerebelos de animales tratados con L-BMAA, una elevada presencia de gránulos lipofusina positivos (gránulos negros) que se corresponderían con una gran actividad lisosomal en la célula. Además, se observan unas invaginaciones bastante pronunciadas de la membrana nuclear, en el caso de células de Purkinje procedentes de cerebelo de animales tratados con respecto al control. En cuanto a la disfunción mitocondrial (B), en las neuronas de los cerebelos de animales tratados con L-BMAA, se observa un hinchamiento de las crestas mitocondriales y una degeneración de las mismas con respecto al control. En la línea C, se observa que aparece una fragmentación del RE y los ribosomas aparecen desanclados en el cerebelo de animales tratados. En la línea D, las células de animales tratados presentan una desestructuración del aparato de Golgi (AG), con un hinchamiento de las cisternas y una pérdida de comunicación de las mismas debida a la fragmentación del orgánulo, mientras que en las células de Purkinje procedentes de los animales control, las cisternas están totalmente paralelas unas con otras formando la estructura característica de este orgánulo (Seawight *et al.*, 1990).

#### 4.2.2. Análisis de GSK3

Para estudiar si los animales tratados con L-BMAA presentan alteraciones en GSK3 $\beta$  como ocurre en los cultivos celulares, se procedió a valorar por western blot la expresión de GSK3 $\beta$  total y fosforilado (P-GSK3 $\beta$  Ser 9) en el cerebelo de animales tratados con L-BMAA.

En la Figura 35, se observa un incremento significativo de los niveles de GSK3 $\beta$  en el extracto total ( $t = 6,380$ ;  $p\text{-valor} < 0,001$ ) y en el núcleo ( $t = 4,043$ ;  $p\text{-valor} < 0,01$ ) de los animales tratados con L-BMAA. Se valoraron las formas fosforilada ( $t = 5,793$ ;  $p\text{-valor} = 0,0044$ ) y activa de GSK3 ( $t = 3,043$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$ ), obteniéndose diferencias significativas en ambos casos.

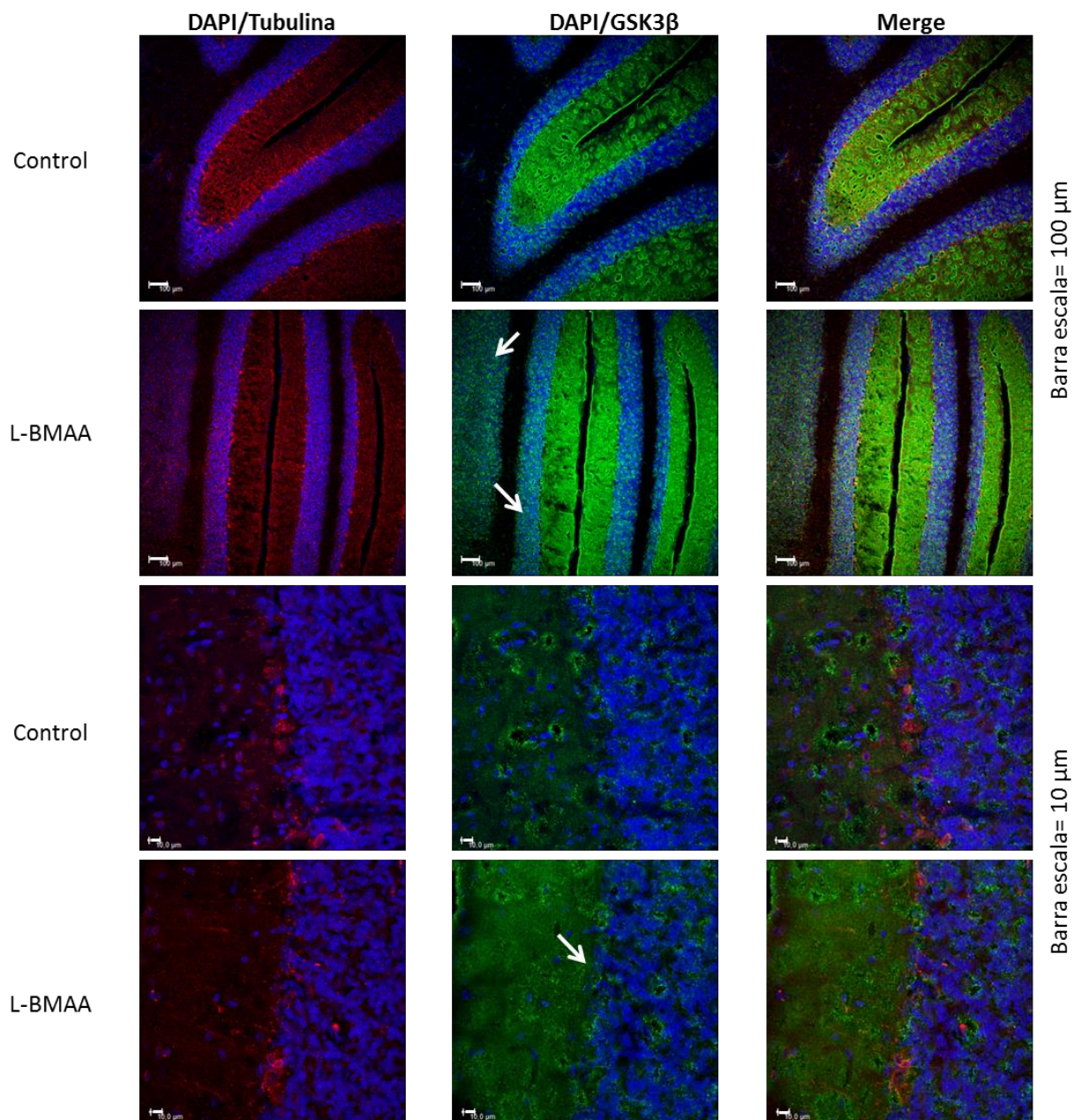




**Figura 35.** Efecto del L-BMAA sobre GSK3β en el cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA. A) Se muestra una imagen representativa de un western blot de los extractos totales, los citosoles y la fracción nuclear de cerebelos procedentes de animales control y cerebelos de animales tratados con L-BMAA. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3β en cada una de las fracciones subcelulares. C) Representación del resultado obtenido para P-GSK3β y mediante cálculo matemático extrapolación para cuantificar el incremento de la fracción activa de GSK3β en los cerebelos de animales tratados con L-BMAA. En todos los

casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). UA: unidades arbitrarias.

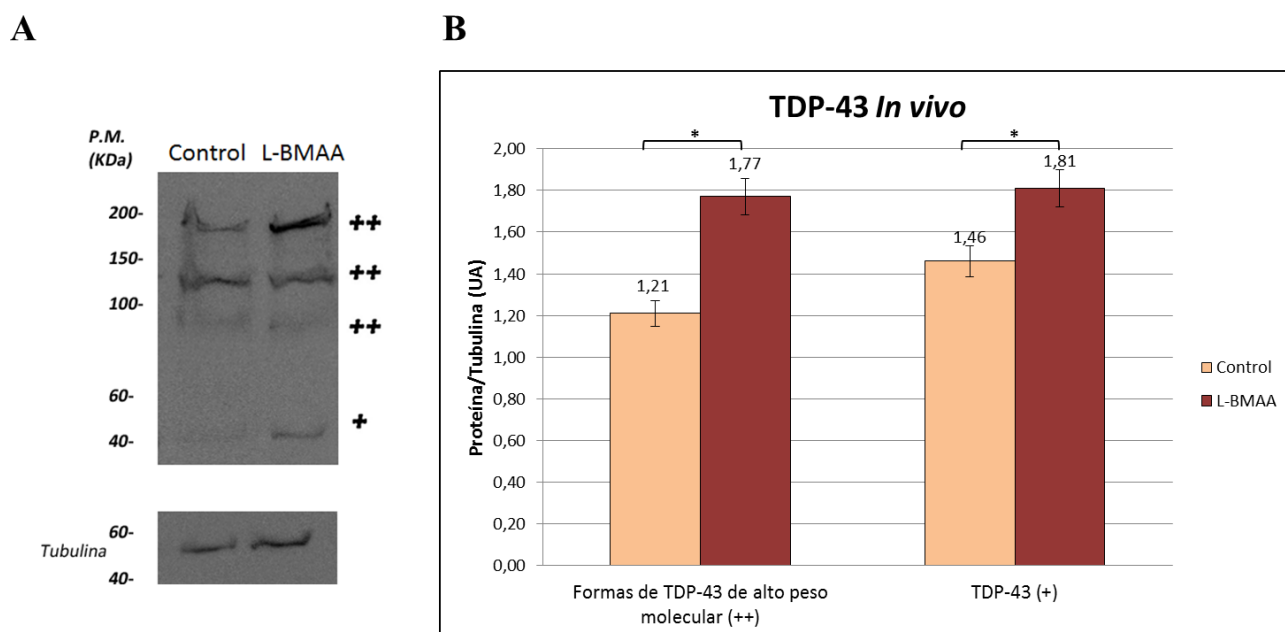
Para apoyar estos resultados se llevaron a cabo análisis de inmunohistoquímica en los animales tratados (Figura 36). Así, en éstos, se observa un mayor marcaje de GSK3 $\beta$  (verde) en la zona de núcleos del cerebelo, teñidos estos a su vez con DAPI (azul) que en la zona citosólica teñida con tubulina (rojo). Por tanto se corrobora el dato obtenido por western blot y podemos concluir que en los cerebelos de animales tratados con L-BMAA se produce un incremento de GSK3 $\beta$ . Dicho incremento se traduce además en una translocación de ese GSK3 $\beta$  desde el citosol hasta el núcleo, pudiendo actuar allí desencadenando la activación de factores de transcripción, íntimamente relacionados con la muerte celular y la neurodegeneración (Bijur y Jope, 2001).



**Figura 36.** Imagen representativa de las capturas obtenidas por microscopía de fluorescencia para cerebelo de animales control ( $n = 3$ ) y de animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ ). En la primera columna se representa el marcaje de DAPI en azul y tubulina en rojo, en la segunda columna el marcaje de DAPI en azul y GSK3 $\beta$  en verde y en la tercera columna se representa la mezcla de las dos imágenes (Merge). Las seis primeras imágenes muestran una panorámica de una cresta cerebelar y la barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ . Las seis imágenes siguientes son un detalle que corresponde a la capa de neuronas de Purkinje de la cresta cerebelar, y en ellas la barra de escala es de 10  $\mu\text{m}$ . Las flechas señalan el incremento de GSK3 $\beta$  observado en los cerebelos de animales tratados con L-BMAA y su colocalización con la zona nuclear (teñida con DAPI de azul).

### 4.2.3. Análisis de TDP-43

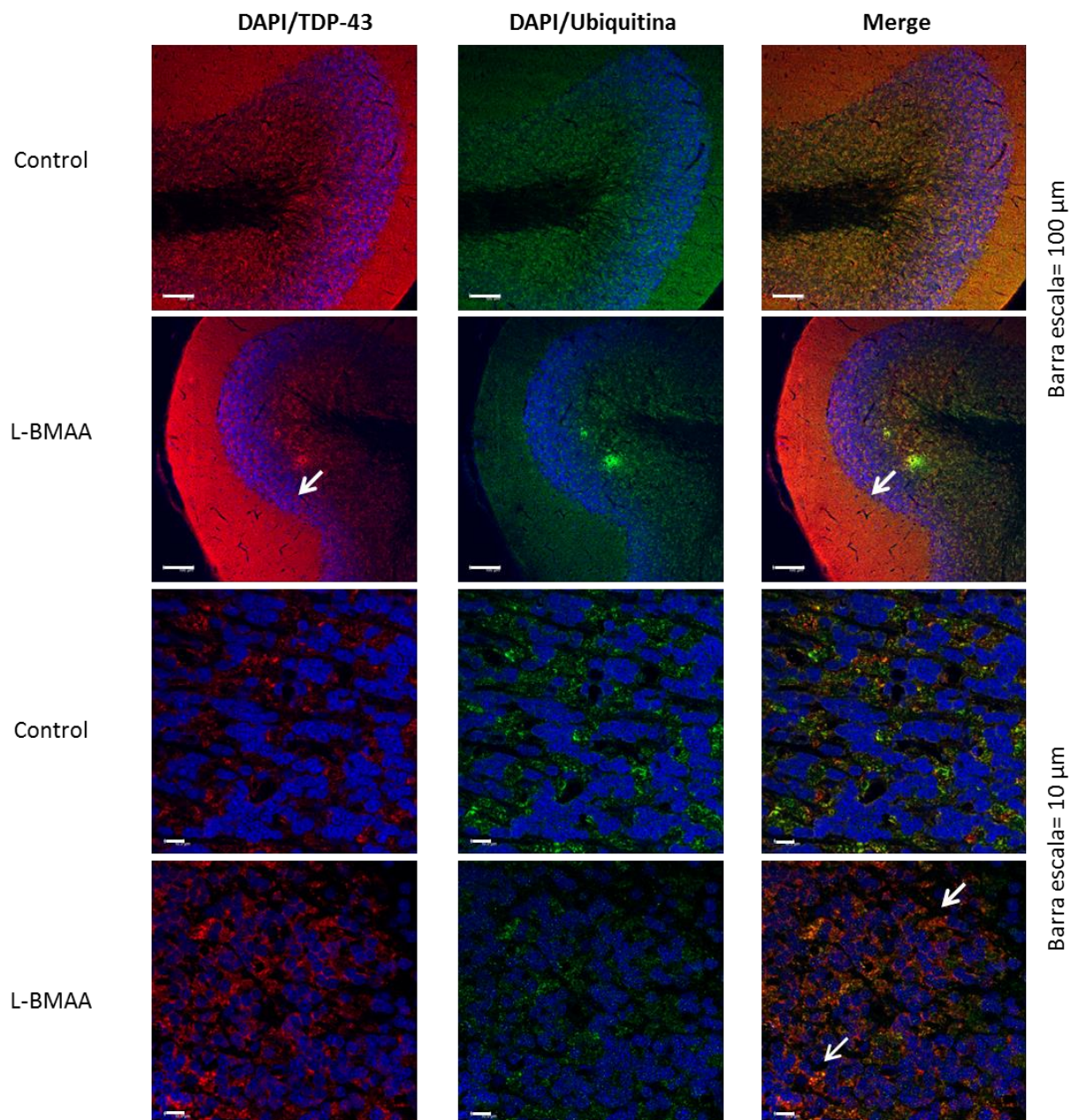
El análisis de TDP-43 en el cerebelo de los animales tratados con L-BMAA (Figura 37), indica que se produce un incremento de un 123,97% de esta proteína, así como un aumento del 146,28% de las formas de TDP-43 de alto peso molecular (para las formas de alto peso molecular  $t = 1,78$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$ , y para TDP-43  $t = 2,01$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$ ).



**Figura 37.** A) Western blot representativo de la fracción proteica insoluble obtenida de los cerebelos de animales control y de animales tratados con L-BMAA. Se marcan bandas de alto peso molecular de TDP-43 (++) y la conformación normal de TDP-43 (+). B) Análisis cuantitativo de las formas de alto peso molecular de TDP-43 y de TDP-43 normal. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ). UA: unidades arbitrarias.

Para valorar si TDP-43 está ubiquitinizada y para determinar su localización subcelular realizamos una serie de ensayos mediante inmunohistoquímica de fluorescencia, realizando un marcaje conjunto de TDP-43 (rojo) y de ubiquitina (verde). Para determinar la localización subcelular marcamos los núcleos con DAPI (azul) (Figura 38).





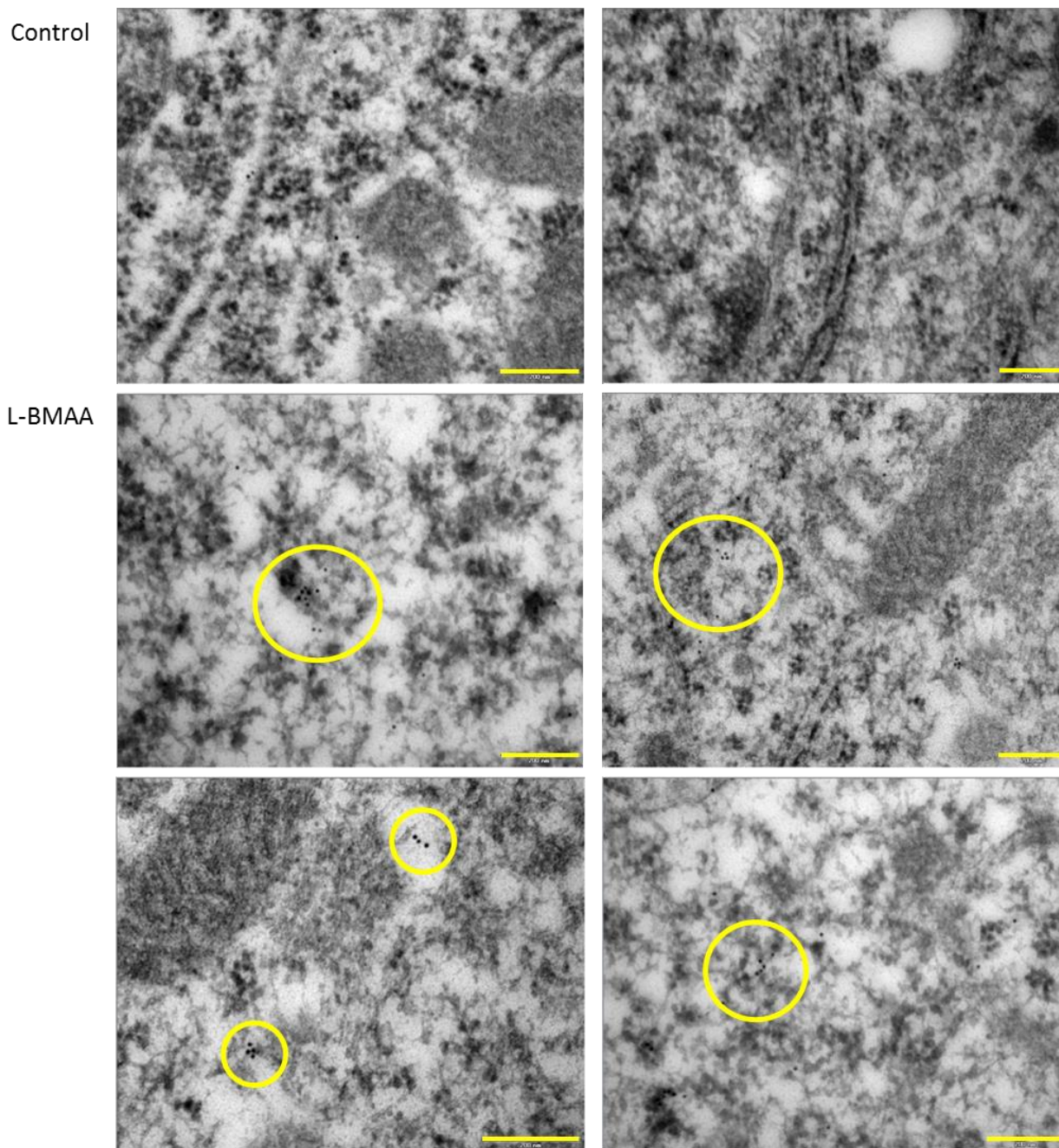
**Figura 38.** Imagen representativa de las capturas obtenidas por microscopía de fluorescencia para cerebelo de animales control ( $n = 3$ ) y de animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ ). En la primera columna se representa el marcaje de DAPI en azul y TDP-43 en rojo, en la segunda columna el marcaje de DAPI en azul y ubiquitina en verde y en la tercera columna se representa la mezcla de las dos imágenes (Merge). Las seis primeras imágenes muestran una panorámica de una cresta cerebelar y la barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ . Las seis imágenes siguientes son un detalle y en ellas la barra de escala es de 10  $\mu\text{m}$ . Las flechas de la imagen panorámica señalan el incremento de TDP-43 observado en los cerebelos de animales tratados con L-BMAA y la flecha del detalle indica la colocalización de TDP-43 con la ubiquitina

---

(coloración anaranjada) en el citoplasma de las neuronas cerebelares de los animales tratados con L-BMAA.

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica de fluorescencia concuerdan con el western blot. Se obtiene un incremento del TDP-43 total en el cerebelo de los animales tratados con L-BMAA, que se ha señalado con flechas en las capturas panorámicas. En cuanto a las capturas del detalle, se observa que en el caso de los cerebelos obtenidos de animales tratados con L-BMAA el TDP-43 (rojo) aparece colocalizando con la ubiquitina (verde) en el citosol de las neuronas produciéndose un color anaranjado (señalado por flechas en la Figura 38). Por tanto, podemos decir que se produce un incremento de la expresión de TDP-43 en los cerebelos procedentes de animales tratados con L-BMAA y se produce también su translocación al citosol donde colocaliza con la ubiquitina (Stallings *et al.*, 2010).

El análisis por inmunohistoquímica en microscopía electrónica nos permite observar inequívocamente la presencia de agregados citosólicos de TDP-43 debido al tratamiento con L-BMAA (Figura 39), corroborando así los resultados.



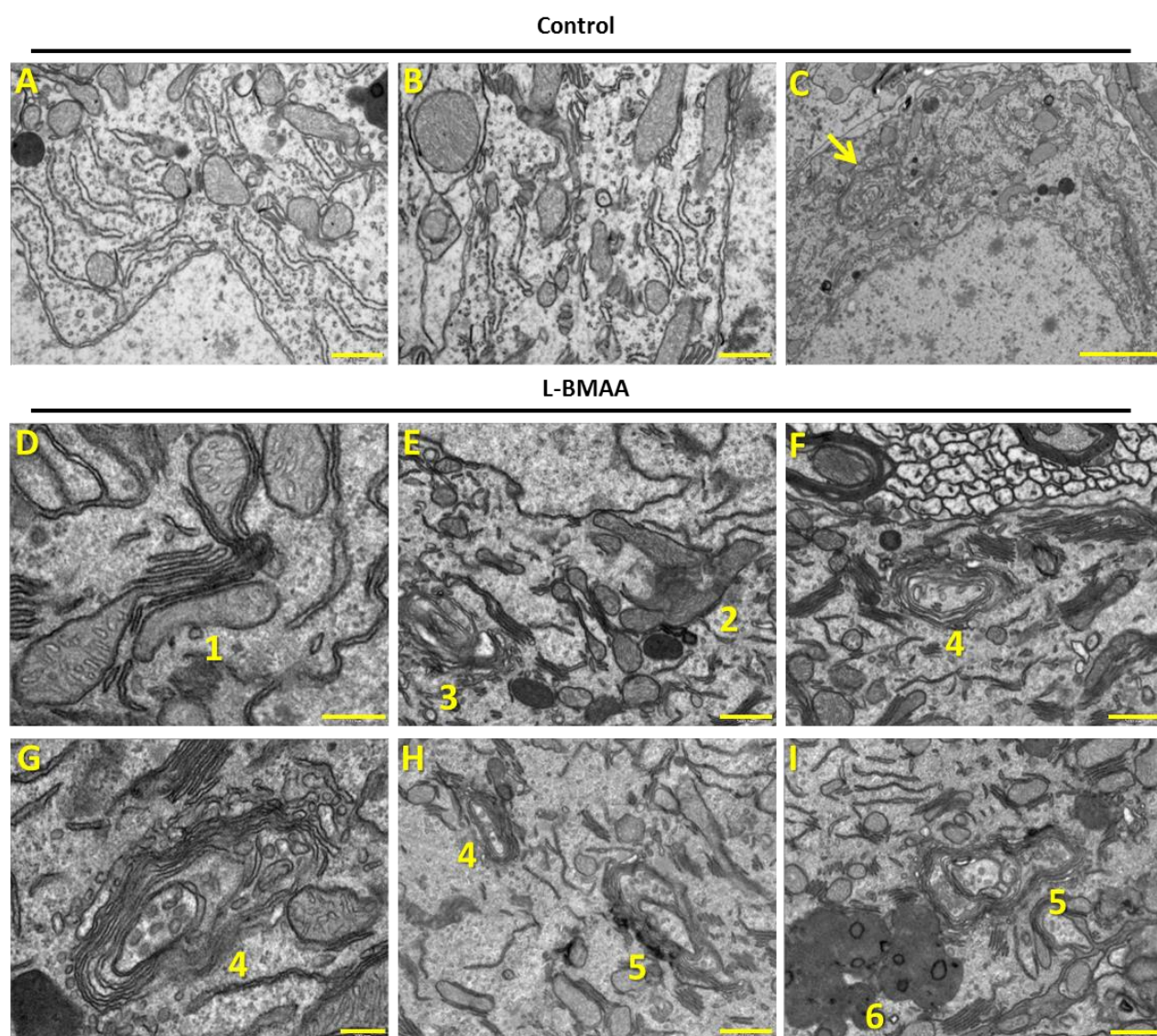
**Figura 39.** Figura representativa de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica para neuronas de Purkinje del cerebelo de animales control ( $n = 3$ ) y de animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ ). Las dos primeras imágenes se corresponden con fotografías realizadas en el citosol de neuronas de Purkinje de animales control. Las bolitas negras son el marcaje obtenido para TDP-43. Se observan agregados de TDP-43, señalados por las flechas amarillas, en el caso de los animales tratados con L-BMAA. En todos los casos la barra de escala es de 200 nm.



#### 4.2.4. Análisis de la autofagia causada por L-BMAA en las motoneuronas cerebelares

Dado que el papel de la autofagia en las enfermedades neurodegenerativas es fundamental, tanto como mecanismo protector del daño como mecanismo de muerte para la célula neuronal (Nassif *et al.*, 2010), es importante valorar la presencia de estos procesos en los cerebelos de los animales tratados con L-BMAA.

Al realizarse las capturas de las imágenes de ultraestructura de los cerebelos de animales tratados con L-BMAA, cuya evaluación neurológica había alcanzado al menos un valor 7, se obtuvieron imágenes en las que claramente se estaban generando procesos autofágicos, con la formación de autofagosomas (Figura 40).





**Figura 40.** Imagen representativa de las fotografías obtenidas por microscopía electrónica convencional para visualizar los procesos autofágicos en las neuronas de Purkinje del cerebelo de animales control ( $n = 3$ ), de la A a la C y de animales tratados con L-BMAA ( $n=3$ ), desde la D hasta la I. El tamaño de las barra de escala de cada una de las imágenes es: A=500 nm, B=500 nm, C=2  $\mu$ m, D=500 nm, E=500 nm, F=200 nm, G=200 nm, H=500 nm e I=500 nm. Se señalan con los números del 1 al 6 las distintas fases del proceso autofágico.

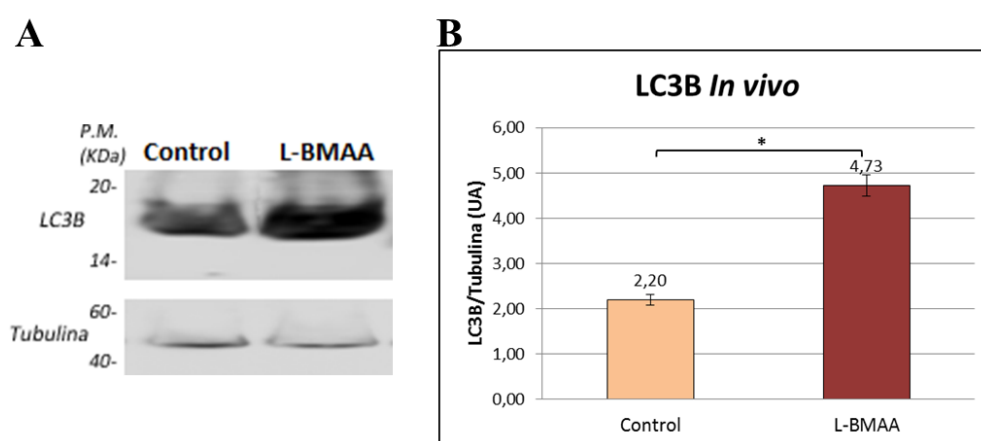
En la Figura 40, se observan imágenes obtenidas por microscopía electrónica de la ultraestructura de neuronas de Purkinje del cerebelo de animales control (imágenes de la A a la C). En la imagen C se señala con una flecha un autofagosoma aún en las fases iniciales de su formación. El resto de imágenes son las más representativas capturadas de células de Purkinje del cerebelo de animales tratados con L-BMAA. Los números que aparecen en las imágenes describen cada uno de los estadios de generación de los autofagosomas descritos por Nassif *et al.* (2010) tal y como se explica a continuación:

- 1) Estructuras internas celulares como el RE y el aparato de Golgi comienzan a envolver a la estructura a degradar, en este caso se trata de una mitocondria.
- 2) Sucede una desestructuración de los orgánulos a degradar. En el caso de las mitocondrias hay un hinchamiento de las crestas mitocondriales, y una alteración de la membrana mitocondrial.
- 3) Autofagosoma temprano. Adquisición de forma redondeada por parte del conjunto a degradar. Se aprecia ya un borde membranoso alrededor de la estructura a eliminar.
- 4) Autofagosoma con las membranas definidas alrededor de la mitocondria a degradar.
- 5) Formación del anfisoma por fusión del autofagosoma con ciertos cuerpos multivesiculares, se aprecia la inclusión de lipofusina en el interior del autofagosoma.
- 6) Presencia de autolisosomas, que nacen de la fusión del anfisoma con lisosomas, y adquieren un color negro en microscopia electrónica debido a la presencia de lipofusina.

Es sabido, que en la mayoría de los procesos neurodegenerativos en los que ocurre una elevada pérdida de la masa neuronal, se desencadenan procesos autofágicos. Por lo

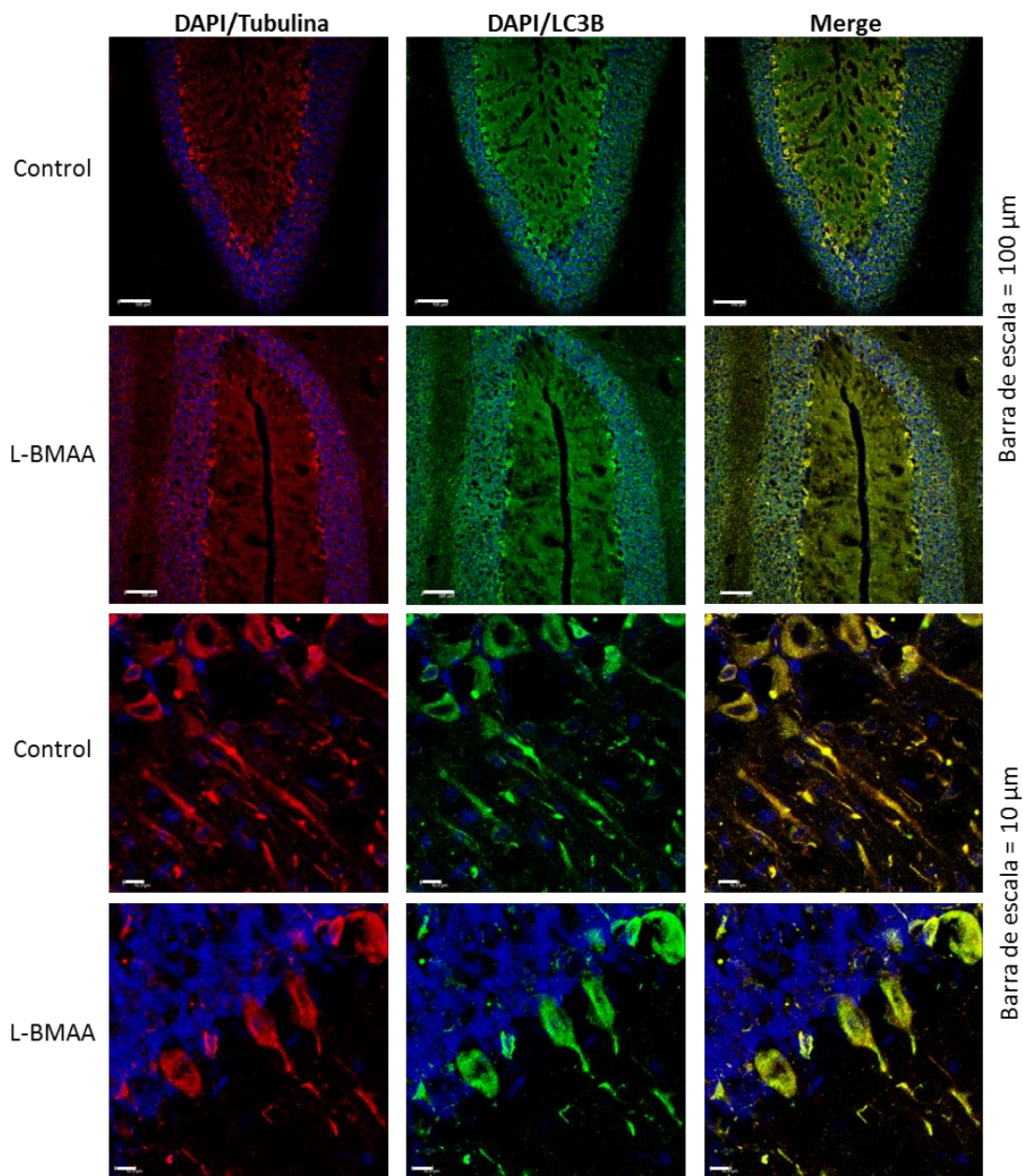
tanto, a continuación se analizó por inmunohistoquímica la presencia del marcador de autofagia LC3B (Kabeya *et al.*, 2000).

Como se muestra en la Figura 41, y en concordancia con los resultados obtenidos por microscopía electrónica, el western blot revela que, el tratamiento con L-BMAA produce un incremento significativo del 187,72% en los niveles de LC3B, en extracto total de cerebelo ( $t = 3,09$ ;  $p\text{-valor} = 0,0363$ ).



**Figura 41.** Efecto del L-BMAA sobre LC3B en el cerebelo de ratas control tratadas con L-BMAA. A) Imagen representativa de un western blot. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para LC3B normalizando con los niveles de tubulina. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ). UA: unidades arbitrarias.

En el estudio inmunohistoquímico de fluorescencia, también se puede observar que el tratamiento con L-BMAA produce un incremento de marcaje para LC3B en el citoplasma de las neuronas de Purkinje del cerebelo (Figura 42).



**Figura 42.** Imagen representativa de las capturas obtenidas por microscopía de fluorescencia para cerebelo de animales control ( $n = 3$ ) y de animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ ). En la primera columna se representa el marcaje de DAPI en azul y Tubulina en rojo, en la segunda columna el marcaje de DAPI en azul y LC3B en verde y en la tercera columna se representa la mezcla de las dos imágenes (Merge). Las seis primeras imágenes muestran una panorámica de una cresta cerebelar y la barra de escala es de 100  $\mu\text{m}$ . Las seis imágenes siguientes son un detalle y en ellas la barra de escala es de 10  $\mu\text{m}$ .

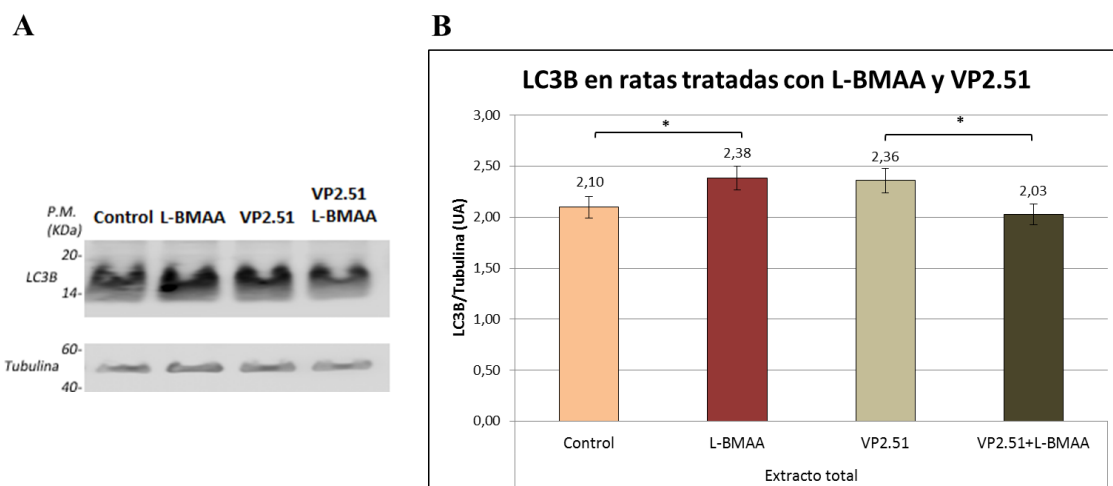
En la Figura 42, se observa que en el caso de las imágenes obtenidas tras el tratamiento con L-BMAA hay un marcaje mayor de LC3B con respecto al control, tanto en la imagen panorámica como en el detalle.

#### 4.2.5. Efecto protector del inhibidor de GSK3 VP2.51

Para completar el estudio de la toxicidad del L-BMAA en el cerebelo de las ratas tratadas y teniendo en cuenta la implicación de GSK3 en procesos degenerativos, nos pareció importante analizar el posible papel protector de la inhibición de GSK3 por moléculas potencialmente terapéuticas, para las cuales se habían obtenido resultados satisfactorios, en estudios realizados con otras enfermedades neurodegenerativas. Entre estas moléculas ensayadas cabe destacar el VP2.51. Esta molécula es sintetizada en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y se trata de un tiazol permeable a la barrera hematoencefálica que actúa como un inhibidor competitivo reversible de GSK3 ( $IC_{50} = 0,62 \pm 0,15 \mu M$ ).

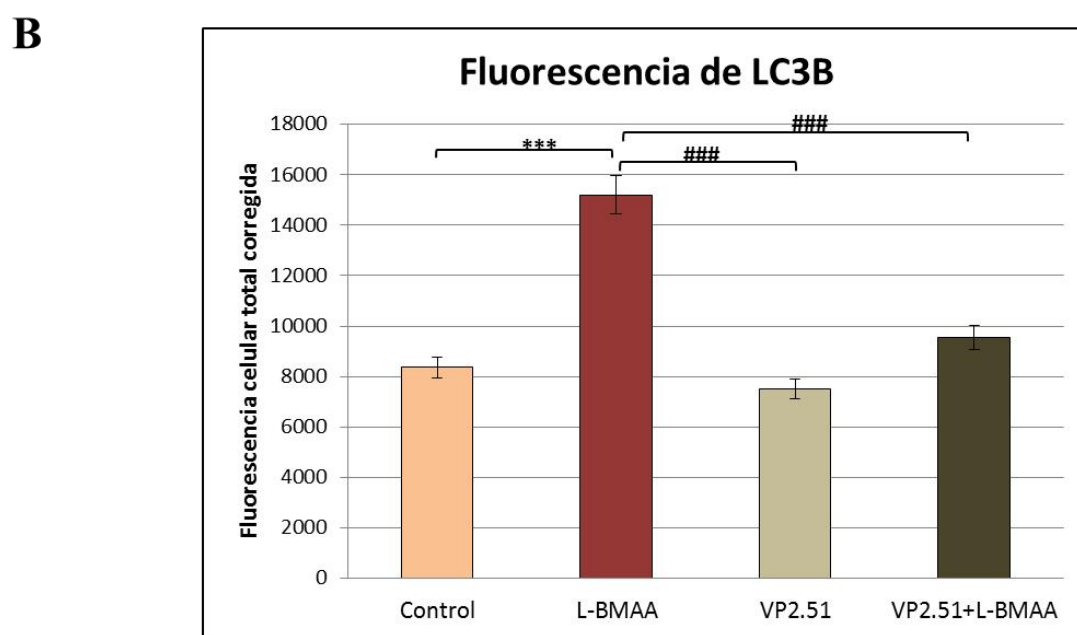
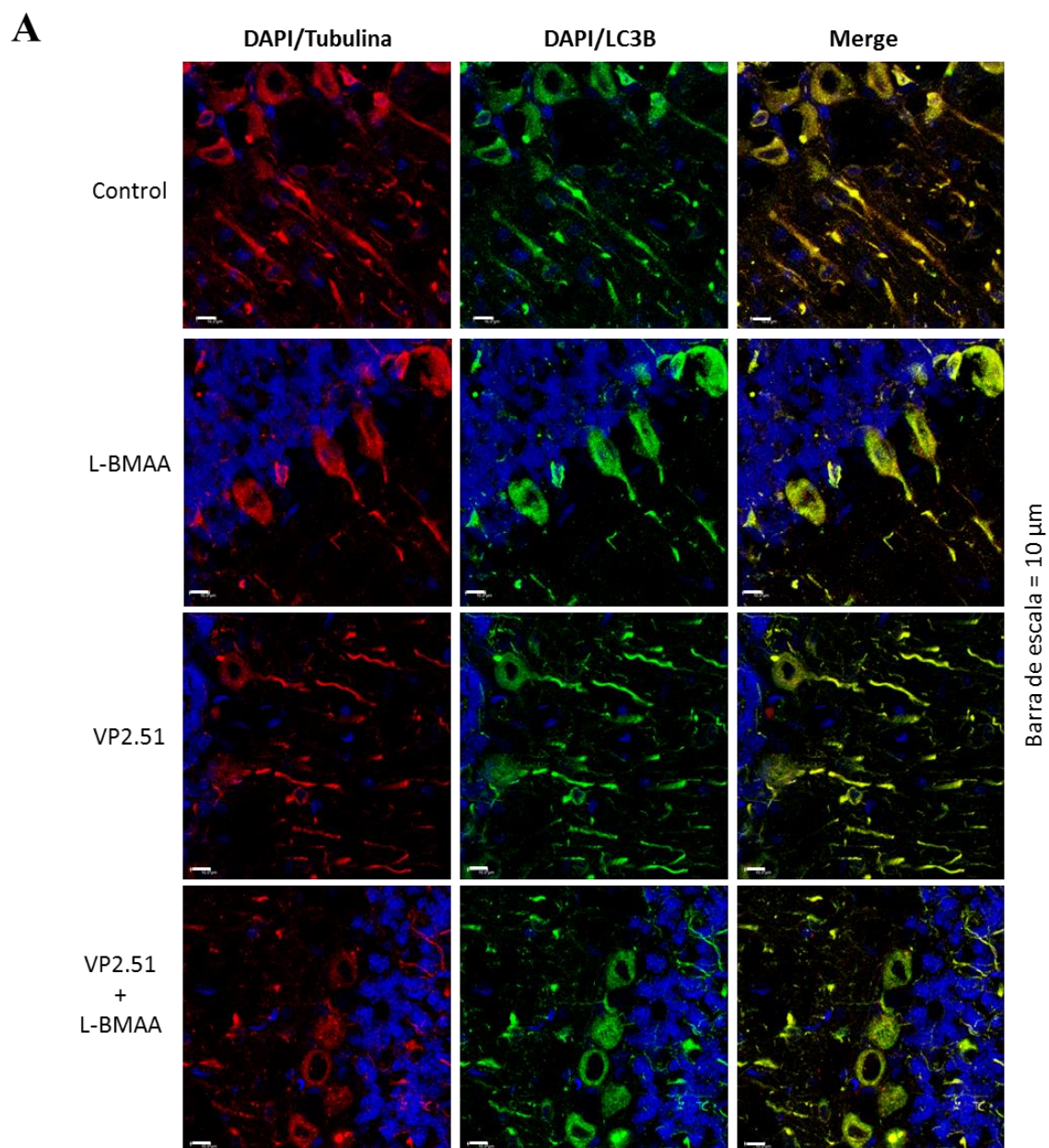
El incremento de expresión de GSK3 $\beta$  se ha visto íntimamente relacionado con su translocación al núcleo (Bijur y Jope, 2001) y con la posible aparición de cascadas de señalización celular deletéreas para la célula (de Munck *et al.*, 2013b). Teniendo en cuenta el incremento de autofagia que se obtiene en cerebelo tras tratar a las ratas con L-BMAA, nos pareció interesante valorar el posible efecto protector del VP2.51 en este proceso.

Los resultados indican que existe una disminución de los niveles del marcador de autofagia, LC3B, en el cerebelo de los animales tratados L-BMAA cuando se administra VP2.51 como protector, de hecho la administración del inhibidor de GSK3 da lugar a una disminución de la expresión de LC3B incluso por debajo del nivel basal (Figuras 43 y 44) (Para el western blot el incremento de LC3B con L-BMAA  $t = 2,813$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$  y la protección con VP2.51  $t = 2,516$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$ ) (Para la fluorescencia, el incremento de LC3B con L-BMAA  $t = 8381$ ;  $p\text{-valor} < 0,001$ ).



**Figura 43.** Efecto del L-BMAA y del VP2.51 sobre LC3B en el cerebelo de ratas. A) Se muestra una imagen representativa de un western blot de extracto total de cerebelo procedente de animales control, animales tratados con L-BMAA, animales tratados con VP2.51 y animales tratados con VP2.51 y L-BMAA. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para LC3B normalizando con los niveles de tubulina. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ). UA: unidades arbitrarias.





**Figura 44.** Efecto del L-BMAA y del VP2.51 sobre LC3B en el cerebelo de ratas. A) Imagen representativa de las capturas obtenidas por microscopía de fluorescencia para el cerebelo de animales control ( $n = 3$ ), animales tratados con L-BMAA ( $n = 3$ ), animales tratados con VP2.51 ( $n = 3$ ) y animales tratados con VP2.51 y L-BMAA ( $n = 3$ ). En la primera columna se representa el marcaje de DAPI en azul y tubulina en rojo, en la segunda columna el marcaje de DAPI en azul y LC3B en verde y en la tercera columna se representa la mezcla de las dos imágenes (Merge). Las imágenes de cerebelo representadas se corresponden con un detalle de las células de Purkinje y en ellas la barra de escala es de 10  $\mu\text{m}$ . B) Cuantificación de la fluorescencia en células de Purkinje. Los datos representados se corresponden con la fluorescencia relativa de LC3B de al menos 60 células. (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo).

Podemos concluir por tanto, que el tratamiento de los animales con VP2.51 + L-BMAA es capaz de disminuir los niveles de autofagia encontrados en el cerebelo de estos animales.

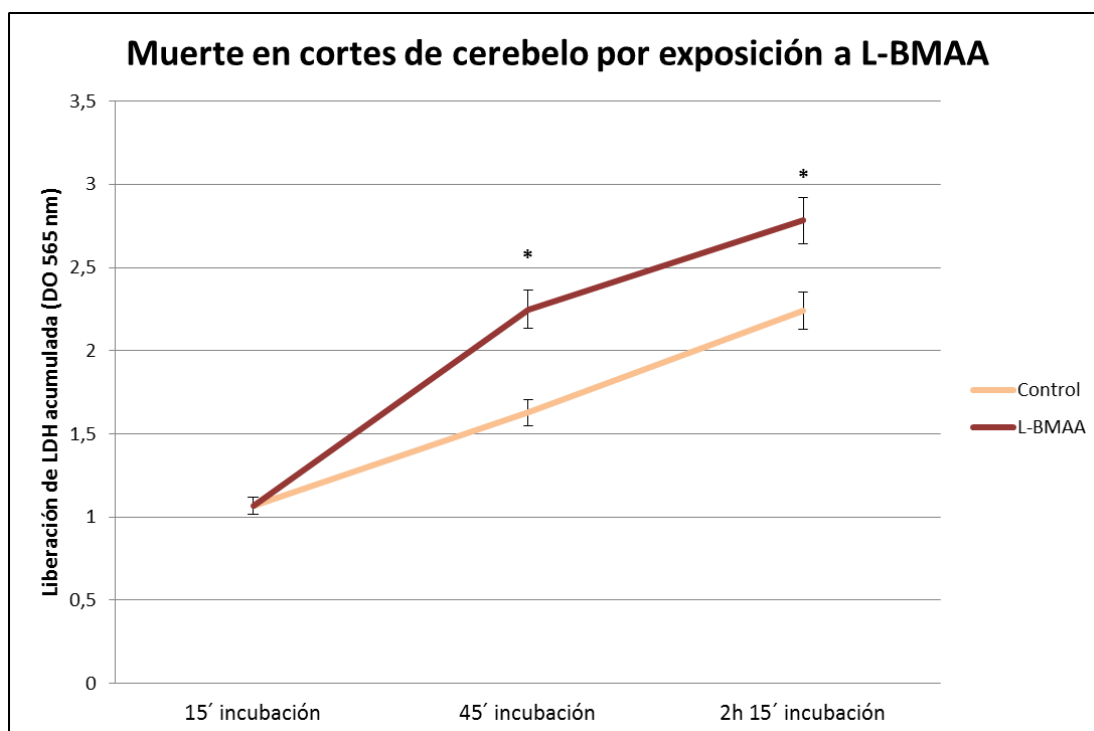
### 4.3. Estudio de la acción del L-BMAA sobre cortes de cerebelo

Los ensayos en las células SH-SY5Y aportan datos interesantes sobre la toxicidad del L-BMAA pero al tratarse de una línea celular, los valores obtenidos pueden diferir de los hallados en otros sistemas. Una situación intermedia entre los experimentos con células y los experimentos *in vivo* es la utilización de cortes de tejido, en concreto de cerebelo. Estos cortes nos permitirán agilizar la experimentación trabajando directamente con el tejido cerebelar. Por todo ello, se recurrió a proseguir el estudio con cortes de cerebelo de rata tratados *in vitro* con L-BMAA en los que se suministraron los tratamientos descritos a partir del punto 3.3 del apartado de material y métodos.

#### 4.3.1. Estudio de la viabilidad celular

Para valorar el efecto del L-BMAA sobre la viabilidad de las células en las incubaciones de los cortes de cerebelo se valoró la actividad de la LDH. Al dañar las células presentes en los cortes de cerebelo, las células sufren alteraciones en la membrana plasmática, aumentando su permeabilidad. Así la enzima LDH es liberada al medio de incubación y valorada mediante técnicas colorimétricas.

En la Figura 45 se observa que tanto el grupo de cortes de cerebelo control, como el grupo de cortes de cerebelo tratados con L-BMAA, presentan un aumento de la liberación de LDH en función del tiempo de incubación, lo cual indica un incremento de la muerte celular, si bien este segundo grupo presenta un incremento significativo de la liberación de LDH respecto al control durante todo el ensayo ( $t = 3,6015$ ;  $p\text{-valor} < 0,05$ ).



**Figura 45.** Representación de la liberación de LDH acumulada en el medio, mediante la medida de densidad óptica a 565 nm (DO 565 nm) a lo largo de diferentes tiempos de incubación. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ).

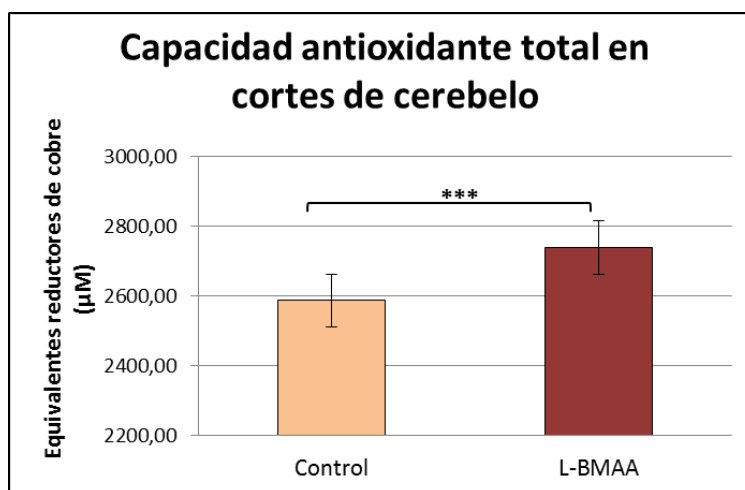
#### 4.3.2. Valoración de la capacidad antioxidante total

Al igual que sucedía en el caso de las células SH-SY5Y tratadas con L-BMAA (punto 4.1.2) y dado que el L-BMAA produce muerte celular en los cortes de cerebelo de rata es importante comprobar el estado de oxidación del tejido incubado con L-BMAA. Por ello, se ha valorado la capacidad antioxidante total en el cerebelo control y en cortes de cerebelo incubados con L-BMAA tal y como se describe en el punto 3.3.5.

Como se puede observar en la Figura 46, existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la producción de equivalentes reductores de cobre  $\mu\text{M}$  con el



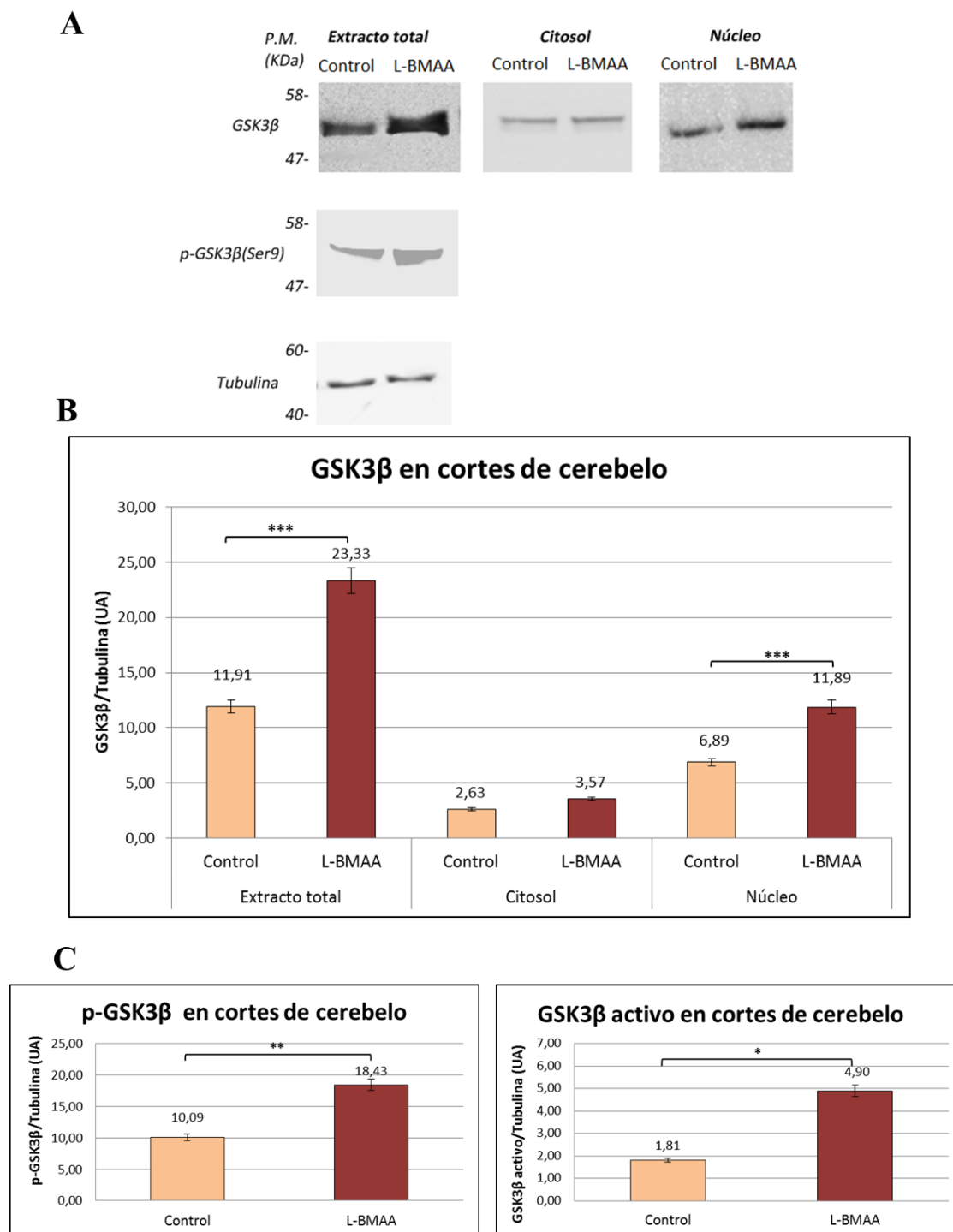
tratamiento con L-BMAA 10 mM incrementándose este valor si los cortes son incubados con el aminoácido excitotóxico ( $t = 186,6$ ;  $p$ -valor  $< 0,0001$ ).



**Figura 46.** Representación gráfica equivalentes reductores de cobre ( $\mu\text{M}$ ) en cortes de cerebelo control y tratados con L-BMAA. Se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.3. Análisis de GSK3 $\beta$

Los experimentos realizados muestran datos similares a los registrados para el cerebelo de los animales tratados *in vivo* con el L-BMAA (Figura 47). Así, se observa un incremento significativo de la expresión de GSK3 $\beta$  en el extracto total ( $t = 8,610$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ) y en el núcleo ( $t = 6,271$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ ) de los cortes de cerebelo incubados con L-BMAA. En cambio los niveles citosólicos de la enzima no son significativamente alterados por el tratamiento. En cuanto al GSK3 $\beta$  fosforilado, se observa un incremento del mismo con el tratamiento con L-BMAA ( $t = 5,683$ ;  $p$ -valor =  $0,0047$ ) y al calcular matemáticamente la fracción de GSK3 $\beta$  activo presente en cortes controles y cortes de cerebelo tratados con L-BMAA se observa un gran incremento de expresión de la forma activa con el tratamiento con L-BMAA ( $t = 6,596$ ;  $p$ -valor  $< 0,05$ ).



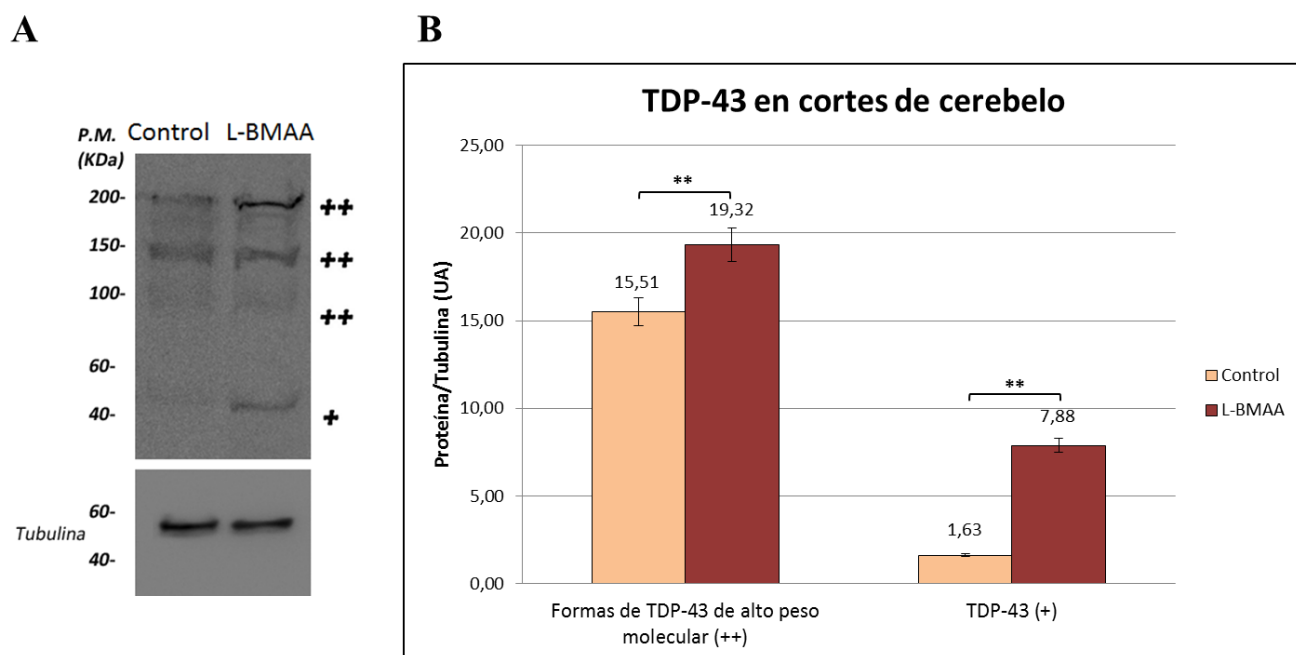
**Figura 47.** Efecto del L-BMAA sobre GSK3β en cortes de cerebelo de rata incubados *in vitro* con L-BMAA 10 mM. A) Se muestra una imagen representativa de un western blot de cortes de cerebelo control y cortes de cerebelo tratados con L-BMAA. Se analizaron los extractos totales, los citosoles y la fracción nuclear. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3β en cada una de las fracciones subcelulares. C) Representación del resultado obtenido para P-GSK3β y mediante cálculo matemático extrapolación para cuantificar el

incremento de la fracción activa de GSK3 $\beta$  en los cerebelos de animales tratados con L-BMAA. Se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). UA: unidades arbitrarias.

#### 4.3.4. Análisis de TDP-43

Al igual que se ha realizado en los otros dos sistemas analizados, en células SH-SY5Y (punto 4.1.6) y en el cerebelo procedente de los animales tratados con L-BMAA (punto 4.2.3), se valoró también los niveles de TDP-43 en los cortes de cerebelo tratados durante 1 hora y 30 minutos con L-BMAA 10 mM.

Nuestros resultados corroboran un incremento de la expresión de TDP-43 (+) ( $t = 7,655$ ;  $p$ -valor = 0,0016) así como un incremento también de las formas de TDP-43 de alto peso molecular (++) ( $t = 4,666$ ;  $p$ -valor = 0,0095) en la fracción proteica insoluble de los cortes de cerebelo tratados con L-BMAA (Figura 48).

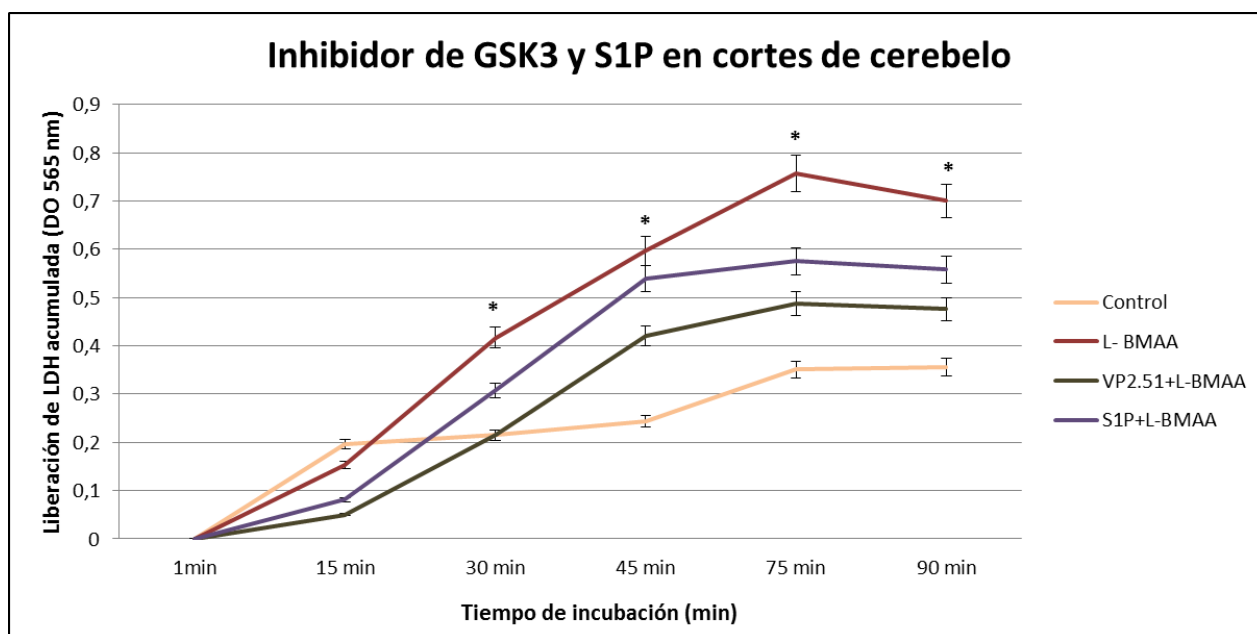


**Figura 48.** Efecto del L-BMAA sobre TDP-43 en cortes de cerebelo de rata incubados *in vitro* con L-BMAA 10 mM. A) Western blot representativo de la fracción proteica insoluble obtenida de los cortes de cerebelos control y tratados con L-BMAA. Análisis de las diferentes especies de TDP-43 incluyendo bandas de alto peso molecular de TDP-43 (++) y la conformación normal de TDP-43 (+). B) Análisis cuantitativo de las formas de alto peso molecular de TDP-43 y de

TDP-43. Se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). UA: unidades arbitrarias.

#### 4.3.5. Efecto protector del inhibidor de GSK3, VP2.51, y del neuroprotector, S1P

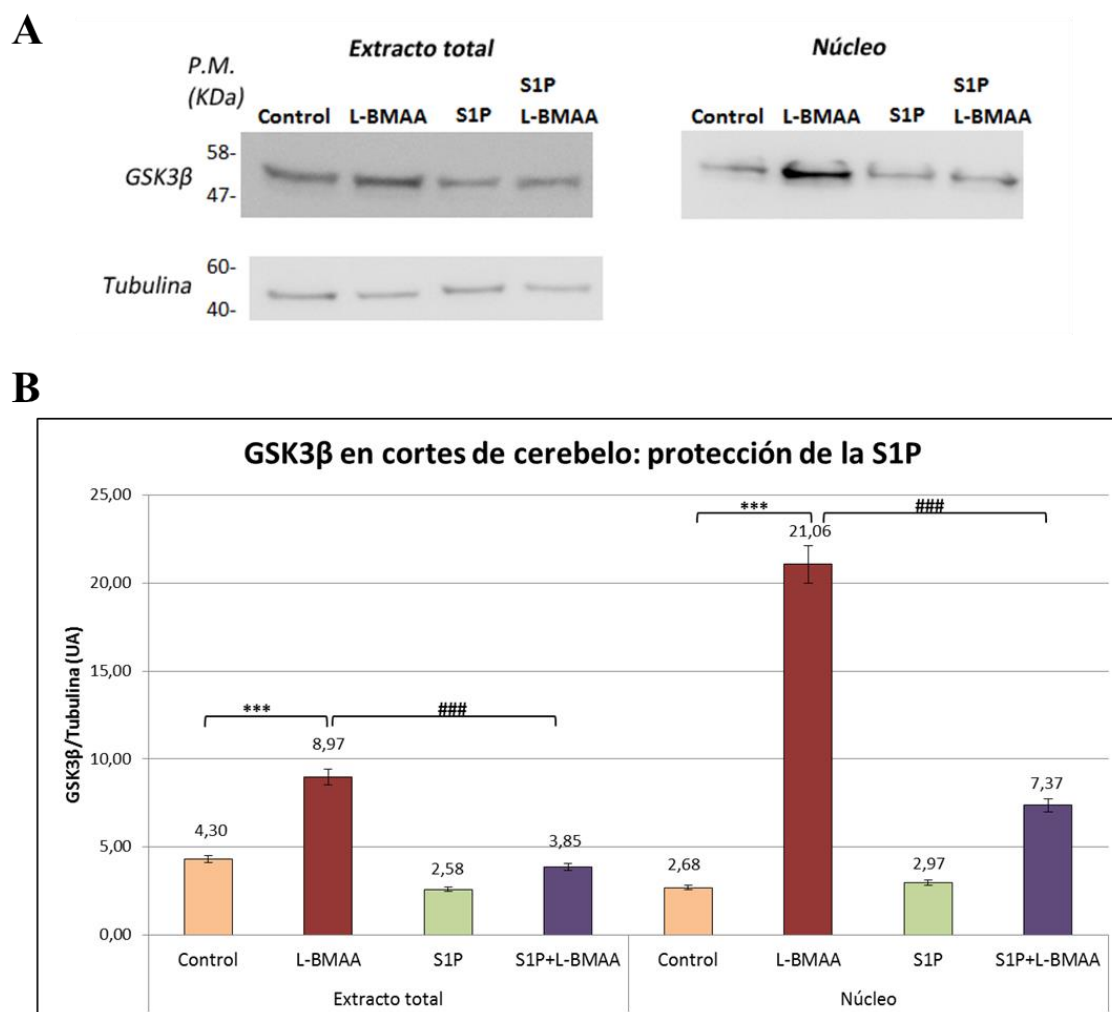
Con el fin de averiguar el efecto del VP2.51 y de la S1P sobre la viabilidad de los cortes de cerebelo incubados con L-BMAA, se realizaron ensayos de liberación de LDH (Figura 49). Se observa que al incubar con el inhibidor de GSK3 y L-BMAA, VP2.51, se obtienen unos valores de liberación de LDH menores que al incubar solo con L-BMAA ( $t = 2,1230$ ;  $p$ -valor  $< 0,05$ ) y lo mismo ocurre con la incubación con S1P y L-BMAA ( $t = 2,354$ ;  $p$ -valor  $< 0,05$ ). En ambos casos la liberación de LDH se encuentra entre los datos obtenidos para el control y los datos obtenidos para el L-BMAA, obteniéndose así una disminución significativa de la muerte comparando con el tratamiento de L-BMAA solo.



**Figura 49.** Representación de la liberación de LDH acumulada en el medio, mediante la medida de densidad óptica a 565 nm (DO 565 nm) a lo largo de diferentes tiempos de incubación. En todos los casos se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ).

Como ya se analizó en las células SH-SY5Y, la S1P 1 $\mu$ M protegía de la muerte celular evitando el incremento de GSK3 $\beta$  causado por la incubación de las células con L-BMAA (punto 4.1.8). Nos pareció interesante corroborar este dato con tejido cerebelar

incubado *in vitro* con el tóxico para comprobar si la S1P actúa igual directamente sobre el tejido.



**Figura 50.** Efecto del L-BMAA y protección por S1P sobre GSK3 $\beta$  en extracto total y fracción nuclear de cortes de cerebelo tratados *in vitro*. A) Se muestra una imagen representativa de un western blot de cortes control y tratados con L-BMAA 10 mM, cortes tratados con S1P 1  $\mu$ M, y cortes con doble tratamiento, S1P y L-BMAA. B) Representación gráfica de los densitometrados obtenidos para GSK3 $\beta$  en las dos fracciones subcelulares. Se representa la media  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparando con respecto al control, #  $p \leq 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$  comparando respecto al L-BMAA solo). UA: unidades arbitrarias.

Se observa que existe una protección del aumento de GSK3 $\beta$  causada por el tratamiento con L-BMAA 10 mM si se administra S1P 1 $\mu$ M (Figura 50). Esta protección sucede tanto en el extracto total de los cortes de cerebelo incubados ( $t = 6,275$ ;  $p$ -valor  $< 0,001$ )

como en su fracción nuclear ( $t = 16,77$ ;  $p\text{-valor} < 0,001$ ) habiendo una disminución significativa de expresión de GSK3 $\beta$  en los tratados con S1P+L-BMAA con respecto al tratamiento con L-BMAA solo.



## **5. DISCUSIÓN**





La exposición al aminoácido neurotóxico L-BMAA ha sido relacionada durante los últimos años con diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la ELA (Chiu *et al.*, 2011). Desde el descubrimiento del L-BMAA (Vega. y Bell, 1967; Vega *et al.*, 1968) ha sido todo un reto el esclarecimiento de su mecanismo de acción y la relación entre este agente neurotóxico y la patología conocida como ELA/PDC. El principal mecanismo por el que el L-BMAA causa neurotoxicidad es su comportamiento como agonista de los receptores de glutamato (Ross *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 2012). Sin embargo, no se conoce en profundidad el mecanismo por el que el L-BMAA causa la muerte celular. Con este trabajo pretendemos esclarecer los mecanismos de acción del L-BMAA y cómo este aminoácido influye sobre la homeostasis de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, cómo afecta al cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA y cómo produce alteraciones en cortes de cerebelo incubados *in vitro* con el neurotóxico.

Los experimentos *in vivo* han demostrado que el L-BMAA puede causar un gran número de disfunciones motoras si es ingerido (Spencer *et al.*, 1987a,b; Perry *et al.*, 1989; Cruz-Aguado *et al.*, 2006) si se inyecta intraperitonealmente (Polsky *et al.*, 1972; Seawright *et al.*, 1990; de Munck *et al.*, 2013b), intraventricularmente (Rakonczay *et al.*, 1991; Matsuoka *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1993) o mediante inyección intraestriatal (Santiago *et al.*, 2006; Buenz y Howe, 2007). Adicionalmente, experimentos realizados *in vitro* demuestran que esta toxina se une a receptores de glutamato dando lugar a efectos deletéreos (Weiss y Choi, 1988; Brownson *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2012). La correlación entre la unión a los receptores de la neurona post-sináptica del L-BMAA y las alteraciones descritas en un organismo vivo han sido el motivo principal de estudio del trabajo de Goto *et al.* (2012), que describe los efectos registrados intracelularmente en el caso de la ingesta de L-BMAA en un organismo vivo como es *Drosophila melanogaster*. Sus resultados reafirman que el L-BMAA actúa como un agonista del glutamato, provocando que los receptores para NMDA permanezcan abiertos durante amplios periodos de tiempo lo cual daña a la célula por excitotoxicidad.

### **5.1. El tratamiento con L-BMAA afecta a la viabilidad celular**

Los primeros resultados de este trabajo fueron los obtenidos para la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el L-BMAA causa muerte neuronal tal y como se observa en los ensayos de viabilidad celular (Figura 20). La alta concentración de L-BMAA requerida para inducir la muerte celular en nuestras condiciones experimentales, puede ser debida a que las células utilizadas son una línea celular inmortalizada SH-SY5Y y las células se están dividiendo continuamente. Por ello, este crecimiento podría compensar la muerte celular que se provoca al ser incubadas con L-BMAA y podría quedar enmascarado el efecto tóxico del mismo. En este sentido, similares concentraciones de L-BMAA han sido utilizadas por otros autores en diferentes estudios usando, igualmente, células de neuroblastoma humano (Lee y McGeer, 2012; Okle *et al.*, 2013; Muñoz-Sáez *et al.*, 2013).

Inicialmente el mecanismo de intoxicación celular por L-BMAA, en presencia de bicarbonato, se ensayó a 24 y a 48 horas, obteniéndose resultados en el mismo sentido para los dos tiempos de incubación y respuestas dependientes de la dosis (Figura 20). La dilución del L-BMAA en bicarbonato, antes de añadirlo al medio de cultivo, es un requisito indispensable para que se genere el carbamato de L-BMAA, que es la molécula que posee similitud estructural con el glutamato, pudiendo así activar sus receptores y desencadenar un efecto neurotóxico (Weiss y Choi, 1988). A la vista de los resultados obtenidos, se descartó el realizar los ensayos a 48 horas dado que, en este caso no se recambió el medio de cultivo para no alterar las concentraciones de L-BMAA y la viabilidad celular podría disminuir también como consecuencia de la escasez de nutrientes, no solo como respuesta al daño ocasionado por el tóxico. Para descartar este efecto, realizamos todos los estudios celulares a 24 horas de incubación de las células con L-BMAA y elegimos la dosis 10 mM para el resto de los experimentos.

Además, comparando las células SH-SY5Y tratadas con 10 mM de L-BMAA con respecto a las células no tratadas hemos observado que la mayoría de la muerte observada inicialmente por MTT se debe a un incremento de la apoptosis y de la necrosis (Figura 29). Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Chiu *et al.* (2012), en los que detectaron marcaje positivo para caspasa-3 tras el tratamiento con L-BMAA.

Las células SH-SY5Y presentan actividad de marcadores enzimáticos (tirosina y dopamina- $\beta$ -hidroxilasa), capturan específicamente norepinefrina, y expresan una o más

de las proteínas de los neurofilamentos. Estas células también expresan receptores para opioides, receptores muscarínicos y para el factor de crecimiento nervioso. La principal ventaja de estas células es que poseen la habilidad de proliferar en cultivo durante largos periodos de tiempo sin contaminaciones, siendo éste un requisito clave para la creación de un modelo celular *in vitro*. Por todo lo descrito anteriormente, estas células han sido ampliamente utilizadas en diseños experimentales neurológicos que estudian la diferenciación neuronal, el análisis del metabolismo y su funcionalidad relacionada con neurodegeneración y con procesos neuroadaptativos. Además, previamente se han desarrollado con ellas estudios sobre neurotoxicidad y neuroprotección (Xie *et al.*, 2010).

La acción citotóxica del L-BMAA se ha estudiado en diferentes áreas del SNC pero muy poco en cerebelo. En 1990, Seawright *et al.*, demostraron que el L-BMAA causa daños en las neuronas cerebelares, pero en años posteriores no se ha profundizado en la acción del neurotóxico en cerebelo (Seawright *et al.*, 1990).

La función principal del cerebelo es la de integrar las vías sensitivas y las vías motoras. Existe una gran cantidad de haces nerviosos que conectan el cerebelo con otras estructuras encefálicas y con la médula espinal. El cerebelo incorpora toda la información recibida para precisar y controlar las órdenes que la corteza cerebral manda al aparato locomotor a través de las vías motoras. Por ello, lesiones a nivel del cerebelo no suelen causar parálisis pero sí desordenes relacionados con la ejecución de movimientos precisos, mantenimiento del equilibrio, la postura y aprendizaje motor (Thach, 1998; Doyon *et al.*, 2003; Bastian, 2011; Gao *et al.*, 2012; Thieme *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta la importancia del cerebelo en la coordinación y el aprendizaje motor, nos pareció interesante estudiar el daño cerebelar causado por este agente neurotóxico.

Los cortes de tejido han sido ampliamente utilizados para examinar la función del SNC, las interacciones específicas de las neuronas y el desarrollo neuronal, especialmente en los campos referidos a la neurobiología, la neurofarmacología y en ensayos neurotoxicológicos como los que se presentan en este trabajo (Lonchamp *et al.*, 2006).

En nuestros experimentos, una vez realizadas las secciones del tejido cerebelar, éstas son incubadas en condiciones fisiológicas con el L-BMAA, con el fin de analizar las

alteraciones producidas por el agente neurotóxico. La facilidad del manejo de los cortes de tejido tiene la ventaja de poder controlar las dosis y los tiempos de exposición. Además, podemos considerar que la técnica de cortes de cerebelo es un sistema de estudio más próximo a los estudios *in vivo*, que los cultivos de neuroblastoma. Por ello, en este trabajo hemos querido complementar la información obtenida acerca del mecanismo de toxicidad producido por el L-BMAA en estos tres sistemas, en la línea celular SH-SY5Y, en el sistema *in vivo* de ratas inyectadas con L-BMAA y en los cortes de cerebelo de rata.

Tras el tratamiento *in vivo* de ratas con L-BMAA, hay que destacar que los animales muestran deficiencias locomotoras en las pruebas de funcionalidad motora, evaluadas mediante la escala de evaluación neurológica elaborada en nuestro laboratorio y descrita por de Munck *et al.* (2013b).

Las lesiones cerebelares no suelen causar parálisis pero sí desordenes relacionados con la ejecución de movimientos precisos, mantenimiento del equilibrio, la postura y el aprendizaje motor. En los trabajos realizados en nuestro laboratorio, las ratas tratadas con L-BMAA presentan alteraciones en la corteza motora y en la médula espinal que dan lugar a una importante afectación neurológica (de Munck *et al.* 2013b). Dado que el cerebelo vigila y corrige las actividades motoras provocadas por otras zonas del encéfalo, una afectación cerebelar producida por el L-BMAA podría contribuir a las alteraciones motoras como el desequilibrio y la lateralización observadas (Figura 33).

Hasta el momento, no se había establecido una correlación directa entre el tratamiento con L-BMAA y las alteraciones motoras como consecuencia de una afectación cerebelar, aunque se sabe que la excitotoxicidad producida por glutamato promueve la muerte de células cerebelares (Staton y Bristow, 1997; Staton y Bristow, 1998). Como se ha dicho anteriormente, el cerebelo está implicado en el control motor como uno de los centros integradores de información. Resultados publicados en nuestro laboratorio ponen de manifiesto el daño que produce el tratamiento *in vivo* con L-BMAA en corteza motora y médula espinal (de Munck *et al.*, 2013b). Podría ser, por tanto, que la información que llega al cerebelo procedente de las neuronas motoras corticales y espinales esté ya alterada por la acción del aminoácido.

Para comprobar si el L-BMAA provoca daños en el cerebelo, se realizaron ensayos de viabilidad en cortes de tejido tratados con L-BMAA (Figura 45). Los resultados ponen

de manifiesto que existe una disminución de la viabilidad del tejido, dado que se registra un incremento de la liberación de LDH al medio. La liberación de la enzima citoplásmica LDH al medio de incubación está directamente relacionada con la existencia de daños en la membrana plasmática de las células. Podemos concluir que con el tratamiento con L-BMAA 10 mM de cortes de cerebelo, a los 45 minutos de incubación ya se produce un incremento significativo de la muerte celular comparada con los controles. Estos datos están de acuerdo tanto con la disminución de viabilidad de las células cerebelares registrada por Staton tras el tratamiento con L-BMAA (Staton y Bristow, 1997; Staton y Bristow, 1998) como con los resultados obtenidos por MTT en el cultivo de células SH-SY5Y incubadas con la toxina, presentados en este trabajo.

Por tanto, los resultados obtenidos en cortes de tejido, podrían indicar que el L- BMAA produce alteraciones directamente en el tejido cerebelar.

## **5.2. El L-BMAA aumenta la producción de radicales libres de oxígeno**

El estrés oxidativo es un punto clave de patologías como la ELA, el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington, la ataxia de Friedreich y los procesos de isquemia y reperfusión (Robberecht, 2000; Calabrese *et al.*, 2004; Calabrese *et al.*, 2005; Agudo-López *et al.*, 2010b; Miana-Mena *et al.*, 2011; Gandhi y Abramov, 2012).

En nuestros ensayos con un tratamiento con L-BMAA en las células SH-SY5Y hemos observado un incremento de los niveles de ROS en las células tratadas con respecto a las células control (Figuras 21 y 22). Estos resultados están de acuerdo con los descritos en neuronas donde el L-BMAA incrementa la producción de ROS (Cucchiaroni *et al.*, 2010) y con los resultados obtenidos por Chiu *et al.* (2013). Además, se ha visto que la exposición al L-BMAA puede alterar la generación de ROS no solo en células animales sino que también altera las defensas antioxidantes presentes en plantas acuáticas (Contardo-Jara *et al.*, 2013).

La causa que desencadena la neurodegeneración lleva a un debate común para muchas enfermedades neurodegenerativas, sobre si el estrés oxidativo es una causa primaria de degeneración, o si es simplemente la consecuencia de otros ataques tóxicos. Uno de los factores de riesgo mejor identificados en el caso de la ELA es el desarrollo de la patología a una edad avanzada, con muy pocos casos descritos antes de los 50 años de

edad del paciente. Se sabe además, que la producción de ROS se incrementa con la edad debido a que se produce el desacoplamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, siendo este proceso también la causa más común del envejecimiento. Aunque es improbable que la acumulación de ROS sea la única causa del inicio de la patología, en algunos casos puede que los puntos clave de los mecanismos homeostáticos de control, para hacer frente a una citotoxicidad estén alterados, haciendo entrar a las células en un ciclo de daños que resulta en una degeneración de las motoneuronas (Barber y Shaw, 2010).

Las células nerviosas, y específicamente las neuronas requieren una protección antioxidante efectiva por varias razones, entre ellas cabe destacar que las neuronas necesitan consumir casi 10 veces más oxígeno que otros tejidos, ya que al no llevar a cabo la división celular su vida es más larga (Gandhi y Abramov, 2012).

Existen múltiples estudios patológicos que demuestran evidencias del incremento de estrés oxidativo en tejidos postmortem de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. Además, se ha visto una elevación de los niveles de proteínas carboniladas en médula espinal (Shaw *et al.*, 1995) y en corteza motora (Ferrante *et al.*, 1997) de afectados de ELA esporádica.-Se han encontrado alteraciones similares de la generación de ROS en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con ELA (Barber y Shaw, 2010). Un incremento de las ROS aparece también en el caso de los modelos animales creados con modificaciones genéticas para recrear la patología de la ELA (Miana-Mena *et al.*, 2011).

Se ha descrito que uno de los efectos del L-BMAA es promover la generación de ROS, sin embargo, el estudio detallado de cómo se generan estos ROS aún está pendiente de ser dilucidado. El L-BMAA parece competir con la cistina en el sistema Xc-, antiporter entre cistina y glutamato, conduciendo a una disminución de la absorción de cistina por las células y consecuentemente a una disminución de glutatión (GSH), un compuesto interno celular formado por ácido glutámico, cisteína y glicina. Dado que el GSH es uno de los antioxidantes más importantes en las células eucariotas, si GSH disminuye se conduce a una alteración en el sistema fundamental de defensa de las células ante ROS (Lobner, *et al.*, 2007). Por otra parte, mediante la inhibición del sistema Xc-, el L-BMAA conduce a la liberación de glutamato desde el interior celular que va a inducir

toxicidad a través de la activación del receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) (Liu *et al.*, 2009).

Otra posible explicación para la inducción de estrés oxidativo por parte del L-BMAA, es la formación de dímeros o polímeros de L-BMAA que puede quelar iones metálicos del medio creando nuevos centros de estrés oxidativo y por tanto puede catalizar la formación de ROS (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2011).

Nuestros resultados han puesto de manifiesto, en los ensayos con cortes de cerebelo en presencia de L-BMAA, que aumenta significativamente la capacidad antioxidante total del tejido (Figura 46).

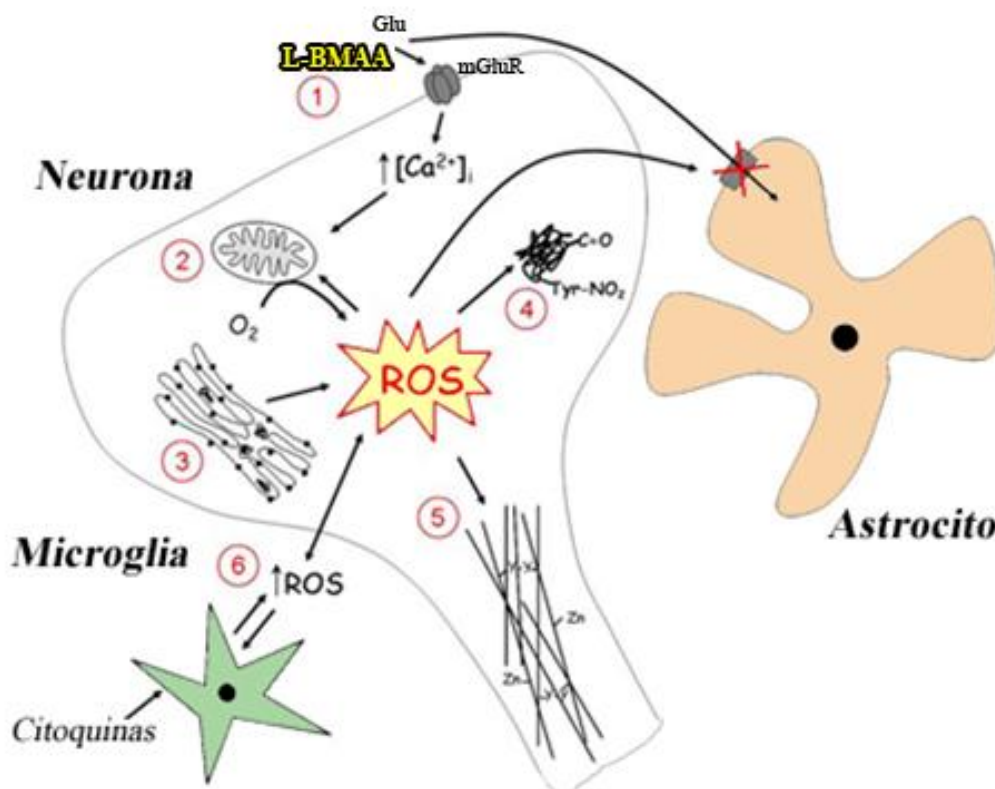
Como se mencionará más adelante (punto 5.3), el incremento intracelular de calcio hace que éste se acumule en las mitocondrias de las motoneuronas tras la exposición a agonistas de receptores de glutamato como son AMPA o Kainato y que se desencadene la generación de ROS (Carriedo, *et al.*, 2000). Como ya se ha dicho, el L-BMAA actúa como agonista de los receptores glutamatérgicos. Barber y Shaw (2010) describieron que las motoneuronas tratadas con AMPA o con Kainato liberan ROS al medio extracelular a unas concentraciones suficientes para inducir oxidación e interrumpir la captura de glutamato por los astrocitos cercanos, creándose así un círculo vicioso de incremento de estrés oxidativo y excitotoxicidad que conduce, en último término, a la degeneración de las motoneuronas. Además, las células neuronales tienen baja capacidad regenerativa y un periodo de vida largo, así que se protegen a sí mismas minimizando la generación de ROS y aumentando la resistencia a las oscilaciones de calcio. Así, es normal que las diferencias en los niveles de calcio que inducen la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y las diferencias de ROS en los diferentes tejidos, oscilen dependiendo del modelo animal en el que estemos estudiando los procesos neurodegenerativos (Panov *et al.*, 2007).

El incremento obtenido de la capacidad antioxidante total en cortes cerebelo en presencia de L-BMAA concuerda con los datos obtenidos previamente sobre la actividad del aminoácido, ya que causa una excitotoxicidad inicial muy elevada durante la cual se produce mucho estrés oxidativo (Barber y Shaw, 2010). Durante este periodo inicial, este aumento podría justificarse por la necesidad de frenar el daño ocasionado. En algunas enfermedades neurodegenerativas como en la ELA, se ha descrito la



presencia de niveles elevados de la capacidad antioxidante total en los fluidos corporales (Ilzecka, 2003).

En la Figura 51 se resumen los procesos que acontecen durante un proceso neurodegenerativo que ha sido desencadenado por la generación de estrés oxidativo como consecuencia del tratamiento con L-BMAA. Inicialmente, el L-BMAA va a actuar sobre los receptores metabotrópicos de glutamato (1), y se produce un incremento de los niveles intracelulares de calcio, que son amortiguados por la mitocondria conduciéndose al aumento de producción de ROS. Las especies reactivas de oxígeno pueden entonces inhibir la captura de glutamato de la brecha sináptica por las células gliales, así que ocurrirá un incremento extracelular de los niveles de glutamato. Por otro lado, la alta demanda energética de las motoneuronas se satisface gracias a las mitocondrias, pero una cadena respiratoria defectuosa conduce también a la formación de ROS (2). Además la activación prolongada de la respuesta a proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico incrementa la producción de ROS (3). Las reacciones oxidativas aberrantes que son catalizadas por la SOD1 incrementan la producción de radicales peroxinitrito e hidroxilo altamente reactivos, causando nitratación y agregación de proteínas incluyendo la SOD1 en sí misma (4). Las ROS pueden atacar a subunidades de los neurofilamentos (5), causando la agregación de los mismos y pueden dificultar la unión del zinc a la SOD1 conduciendo a una actividad enzimática aberrante. Las especies reactivas de oxígeno podrían cruzar la membrana celular y activar la microglia, (6) que respondería liberando citoquinas y produciría más ROS.



**Figura 51.** Mecanismos neurodegenerativos desencadenados por la generación de estrés oxidativo producido tras la exposición a L-BMAA. Figura adaptada de Barber y Shaw (2010).

Podría decirse por tanto, que la muerte celular hallada en el cerebelo de los animales tratados con L-BMAA es ocasionada, al menos en parte por la excitotoxicidad que desencadena un marcado incremento de estrés oxidativo en el cerebelo y en términos finales conduce a la neurodegeneración.

### 5.3. Afectación mitocondrial causada por el L-BMAA

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de cerebelo de animales tratados con L-BMAA (Figura 34) ponen de manifiesto que existe hinchamiento, vacuolización y fragmentación mitocondrial de las células de Purkinje en el cerebelo de las ratas tratadas con L-BMAA. Estos resultados coinciden con los encontrados en estudios de la patología de la ELA y en estudios de intoxicación con L-BMAA en otros tejidos (Costa *et al.*, 2010; de Munck *et al.*, 2013b). Como consecuencia de la alteración de la morfología mitocondrial, el daño de la membrana mitocondrial descrito en los mutantes para SOD1 puede inducir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, causando una disrupción de la actividad de la cadena respiratoria, y una reducción de la capacidad

amortiguadora de calcio (Shi *et al.*, 2010a). La disfunción mitocondrial puede desencadenar la neurodegeneración y puede ser un paso crítico para el desarrollo de las patologías neurodegenerativas. Las proteínas patógenas en los enfermos de Alzheimer, de Parkinson, de Huntington y de la ELA causan directa o indirectamente esta disfunción mitocondrial, dañando al ADN mitocondrial, generando radicales libres de oxígeno, disminuyendo la producción de ATP y desencadenando procesos apoptóticos (Yang J.L. *et al.*, 2008; Reddy, 2008, de Munck *et al.*, 2013b).

Se sabe que la disfunción mitocondrial es una alteración común en muchas enfermedades neurodegenerativas. La implicación de la disfunción mitocondrial tanto en enfermedades neurodegenerativas heredadas como en esporádicas apunta a la necesidad de desarrollar terapias para tratar dichas alteraciones que aparecen en edades avanzadas (Reddy, 2008).

Las mitocondrias juegan un papel complejo en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas debido a su implicación en un amplio número de procesos, incluyendo la regulación de la excitotoxicidad, la homeostasis del calcio intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno y los procesos apoptóticos (Lezi y Swerdlow, 2012). La estructura, la posición y la función de la mitocondria están reguladas por la biogénesis mitocondrial, los procesos de fisión y fusión, el transporte y el aclaramiento mitocondrial. Por ello, la disfunción mitocondrial confiere efectos pleiotrópicos en las células, especialmente en neuronas con una elevada susceptibilidad al envejecimiento y al estrés. Así, la patología mitocondrial es un punto clave entre las múltiples hipótesis de trabajo de estudio de las enfermedades neurodegenerativas (Manfredi y Xu, 2005; Shi *et al.*, 2010b). La implicación de las alteraciones mitocondriales en las enfermedades neurodegenerativas se ha demostrado en numerosos estudios constituyendo este orgánulo una diana de la toxicidad observándose, mediante técnicas histopatológicas, la presencia de vacuolas y mitocondrias dilatadas, con crestas y membranas desorganizadas en las neuronas motoras en el caso de la ELA (Afifi *et al.*, 1966; Hirano *et al.*, 1984a; Reddy, 2008). Los defectos mitocondriales han sido registrados en médula espinal y biopsias de pacientes con ELA, dichos defectos van desde una respiración mitocondrial dañada hasta unos niveles incrementados de proteínas desacopladas (Chung y Suh, 2002; Reddy, 2008). Estudios de microscopía electrónica muestran anomalías morfológicas en el músculo esquelético, el hígado, motoneuronas espinales y motoneuronas de regiones corticales superiores de pacientes

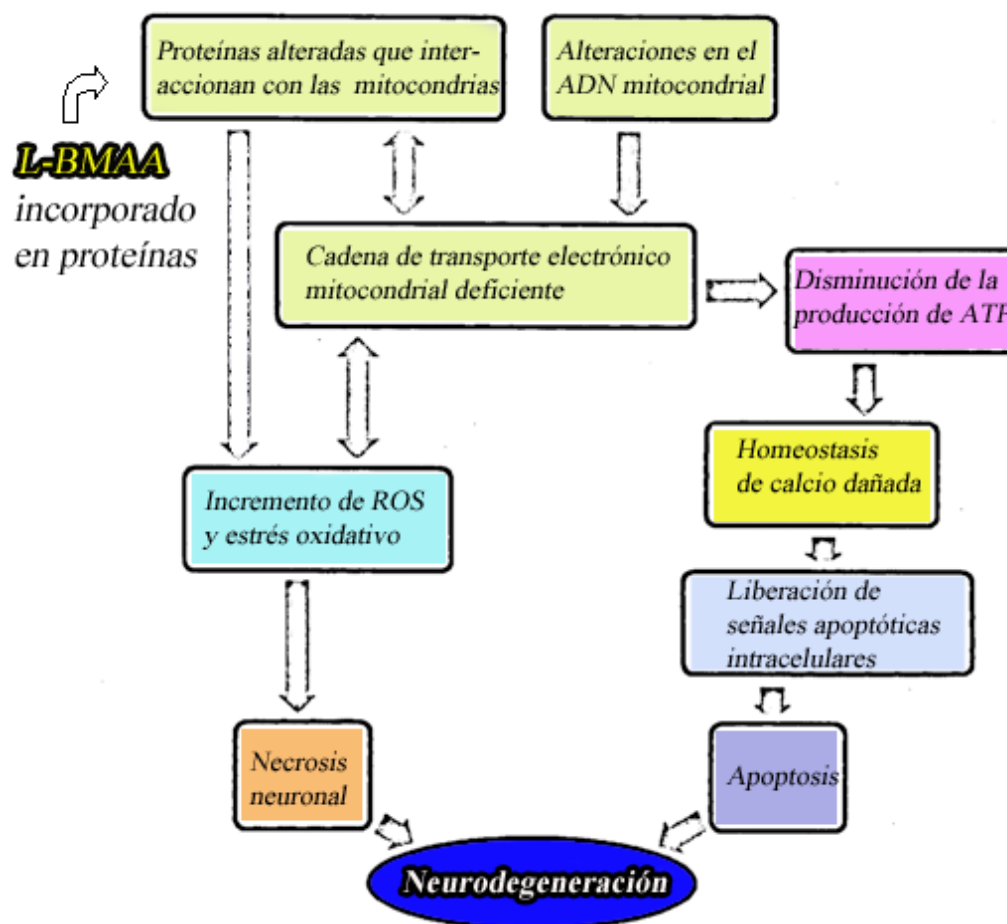
con ELA (Sasaki e Iwata, 1999; Menzies, *et al.*, 2002b; Martin, 2010). Datos similares han sido los obtenidos en el presente trabajo para neuronas de Purkinje del cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA (Figura 34).

Nuestros resultados demuestran que el L-BMAA produce alteraciones mitocondriales tales como la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento de calcio dentro de este orgánulo (Figuras 23 y 24).

Con respecto a estos datos, queremos destacar que la mitocondria actúa como un reservorio de calcio, amortiguando las oscilaciones del calcio citosólico. Un exceso de calcio en el citosol resulta en la activación de proteasas, lipasas, y DNAsas dependientes de calcio, conduciendo a la muerte celular (Doyle *et al.*, 2008; Chiu *et al.*, 2013). El incremento del calcio citosólico incrementa los niveles de calcio mitocondrial a través el uniporter de calcio (Rizzuto y Pozzan, 2006; Putney y Thomas, 2006) ya que bajo condiciones de elevado calcio citoplásmico, siempre que la concentración de calcio local aumente de los 0,5  $\mu\text{M}$ , la mitocondria ávidamente incorpora este exceso para mantener los niveles intracelulares constantes (Nicholls, 2002). Esta sobrecarga de calcio en la mitocondria también se ha encontrado previamente en procesos neurodegenerativos. (Siklós *et al.*, 1996; Brownson *et al.*, 2002). El gradiente eléctrico a través de la membrana interna mitocondrial es establecido por la activación de la cadena de transporte de electrones, aportando la fuerza necesaria para conducir la acumulación del calcio al interior de la matriz mitocondrial (Babcock y Hille, 1998). Las concentraciones de calcio citosólico por encima de los niveles de referencia se cree que pueden ser alcanzadas durante la estimulación tetánica y por la activación de los receptores de glutamato de la membrana plasmática (Nicholls, 2002). Cuando esta sobrecarga además es acompañada de estrés oxidativo, produce la apertura del poro de transición mitocondrial, alterando la permeabilidad de las mitocondrias, lo que resulta en un hinchamiento osmótico y en la ruptura de la membrana mitocondrial externa (Chiu *et al.*, 2011) conduciendo en términos finales a la muerte celular (Halestrap y Pasdois, 2009; Martin, 2010). La susceptibilidad de las mitocondrias a este proceso depende de si dichas mitocondrias pertenecen a neuronas sinápticas o a neuronas no sinápticas, siendo las mitocondrias de neuronas sinápticas las más propensas a esta sobrecarga (Brown *et al.*, 2006).

Por otro lado, y en referencia a la despolarización de la membrana mitocondrial, es importante destacar que en la cadena de transporte de electrones, los protones son excretados desde la matriz hasta el espacio intermembrana, generando el potencial de membrana mitocondrial. En condiciones normales, el potencial de membrana es aproximadamente de -150 mV, dependiendo de la velocidad de salida de los protones. Este potencial y la permeabilidad a iones, especialmente al calcio como ya se ha mencionado previamente, son específicos de cada ion en condiciones fisiológicas. Un error en el sistema de amortiguamiento del calcio citosólico puede desencadenar un incremento patológico de este ion en el interior de las células, esto es, una desregulación del calcio. Este fenómeno puede suceder como consecuencia a la despolarización de la membrana mitocondrial y desencadena el flujo de calcio que se desplaza desde la matriz hasta el citoplasma, con la consecuente alteración de la homeostasis de sodio, y finalmente desencadena en la muerte celular (Iijima, 2006).

La mayoría de la investigación realizada, en torno a la afectación mitocondrial hallada en los sistemas de estudio de neurodegeneración se basan en las alteraciones que ocurren en el caso de modelos animales que recrean la patología de la ELA con mutaciones genéticas de la enzima superóxido dismutasa (Shi *et al.*, 2010a; Lezi y Swerdlow, 2012) y no describen las alteraciones que aparecen en el caso de la ELA esporádica. Estudios preliminares muestran vacuolas con mitocondrias degenerando en los axones y en las dendritas de neuronas motoras en un modelo de ratón presintomático que sobreexpresa SOD1 (Wong *et al.*, 1995) Además, en pacientes de ELA esporádica aparecen conglomerados densos de mitocondrias en el asta anterior de la médula espinal lumbar y en axones proximales (Hirano *et al.*, 1984b; Sasaki e Iwata, 1996). Se han registrado también asociaciones anormales de mitocondrias en axones motores del modelo de ratón transgénico para SOD1 (Sotelo-Silveira *et al.*, 2009). La fragmentación masiva de mitocondrias ha sido hallada en cultivos de células NSC34 que sobreexpresan SOD1 (Menzies *et al.*, 2002a; Raimondi *et al.*, 2006). Existe un estudio más profundo de la vacuolización de las mitocondrias en la médula espinal realizado en el modelo de ratón transgénico para SOD1, G93A (posee una mutación en G93A) (Higgins *et al.*, 2003).



**Figura 52.** Resumen de las relaciones entre las mitocondrias y otras características que conducen a neurodegeneración tras la exposición al L-BMAA. Figura adaptada de Lezi y Swerdlow, 2012.

#### 5.4. Alteraciones que produce el L-BMAA en la vía secretora: retículo endoplásmico y aparato de Golgi

Las imágenes de microscopía electrónica obtenidas para valorar la ultraestructura del cerebelo, confirman que en las motoneuronas cerebelares y más concretamente en las neuronas de Purkinje está alterada la vía secretora por el tratamiento con L-BMAA.

En las neuronas de Purkinje del cerebelo de las ratas tratadas con L-BMAA, hemos observado una abundante fragmentación del retículo endoplásmico y muchos ribosomas libres dispersos por el citosol (Figura 34). Si el estrés del RE no se elimina se activan respuestas apoptóticas que implican una interacción entre el RE y las mitocondrias que en términos finales conduce a la apoptosis (Rutkowski y Kaufman, 2004; Szegezdi *et*

*al.*, 2009). Por esta razón, el estrés del RE es considerado un mediador común de la apoptosis en procesos neurodegenerativos (Gorbatyuk y Gorbatyuk, 2013). Estas respuestas están de acuerdo con el estrés del retículo endoplásmico descrito en médula espinal de pacientes con ELA (Urano *et al.*, 2000; Murch *et al.*, 2004; Igaz *et al.*, 2011; de Munck *et al.*, 2013b). Además, se ha sugerido que el desensamblaje del retículo endoplásmico en estos casos de ELA, puede estar asociado a alteraciones de TDP-43 (Walker y Atkin, 2011). Adicionalmente, Okle *et al.* (2013) han descrito que las células SH-SY5Y tratadas con bajas concentraciones de L-BMAA presentan una desregulación de la homeostasis proteica con el consiguiente estrés del retículo endoplásmico, que es independiente de los efectos debidos a las altas concentraciones, como la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. El estrés del RE contribuye al asentamiento y progresión de los desórdenes de motoneuronas como se observa en los casos de ELA/PDC en Guam (Okle *et al.*, 2013). La distensión de las cisternas del RE observada en las neuronas de Purkinje del cerebelo de los animales tratados con L-BMAA y el desanclaje de los ribosomas del RE, observado por microscopía electrónica (Figura 34), concuerda con los datos obtenidos por Oyanagi *et al.* (2008) en neuronas motoras del tronco encefálico y de médula espinal en procesos neurodegenerativos. El desanclaje de los ribosomas y su dispersión por el citoplasma podría ser la causa de la distensión de las cisternas del RE en los cerebelos de ratas tratadas con L-BMAA. En este sentido Oyanagi *et al.* (2008) han propuesto previamente que la aparición de ribosomas dispersos por el citoplasma podría ser la causa de la distensión de las cisternas del RE.

Los resultados obtenidos están apoyados por el trabajo de Yue *et al.* (2002), que describen alteraciones ultraestructurales en las neuronas de Purkinje que afectan a la vía secretora en el caso del ratón Lurcher. Este ratón es un mutante semidominante que en heterocigosis presenta ataxia, como consecuencia de la afectación de las células de Purkinje debido a una ganancia de función del receptor de glutamato  $\delta 2$  (Vogel *et al.*, 2007).

En las neuronas, así como en las células eucariotas, el RE es importante para la síntesis, plegamiento y modificación post-transduccional de proteínas transmembrana y solubles (Ron y Walter, 2007). Además, el RE sirve como almacén de calcio y es el lugar de biosíntesis de esteroides, colesterol y otros lípidos, jugando un papel crucial en la biogénesis de orgánulos y en la señalización celular (Nagley *et al.*, 2010). El estrés del RE está causado por la perturbación de cualquiera de sus funciones y va a conducir a la

acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen. Normalmente, la habilidad de plegar proteínas del RE es dinámica y se modifica de acuerdo al flujo de cadenas polipeptídicas sin plegar que llegan al orgánulo. Por ello, se logra un control homeostático a través de una combinación de acciones de las vías de señales de transducción, llamada respuesta a proteínas mal plegadas (Schröder, 2008). Las alteraciones celulares que conducen al estrés del RE incluyen la privación de nutrientes, las alteraciones del estado de reducción-oxidación del RE, la síntesis de proteínas de secreción o las concentraciones intracelulares de calcio (Nagley *et al.*, 2010).

El estrés del RE establece una interconexión de las vías de señalización celular afectadas en las enfermedades neurodegenerativas. La relación entre el estrés oxidativo y el estrés del RE en la ELA esporádica fue sugerida, por primera vez, en un estudio que correlacionaba la coexistencia de daño oxidativo a proteínas del RE y chaperonas, con la presencia de estrés del RE en la médula espinal (Ilieva *et al.*, 2007). Adicionalmente, el L-BMAA se ha visto relacionado con un incremento del estrés del RE en cultivos neuronales incluso a concentraciones muy bajas (Okle *et al.*, 2013).

La activación de la respuesta a proteínas mal plegadas puede incrementar la generación de las especies reactivas de oxígeno a través del plegamiento, en condiciones oxidantes, de dichas proteínas, dando lugar a daño celular y apoptosis (Atkin *et al.*, 2008; Walker y Atkin, 2011).

El análisis por microscopía electrónica del cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA indica que la intoxicación con este aminoácido produce una desestructuración del AG en las células de Purkinje, poniendo de manifiesto la alteración de la vía secretora (Figura 34). Estos hallazgos son compatibles con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, en los que se describe una fragmentación del AG, así como un engrosamiento de sus cisternas en motoneuronas de la médula espinal lumbar de ratas tratadas con L-BMAA (de Munck *et al.*, 2013b).

De hecho, la fragmentación del AG es una característica que aparece repetidamente en procesos neurodegenerativos como el Alzheimer, la Corea de Huntington y la ELA (Gonatas, *et al.*, 1992; Stieber, *et al.*, 2000; Turner y Atkin, 2006). Existen estudios que han intentado establecer una relación entre el AG y la ELA, aunque no se ha averiguado si las alteraciones de este orgánulo son una causa o una consecuencia de la



neurodegeneración en las motoneuronas que aparece en los pacientes que sufren esta patología (Gonatas *et al.*, 1992; Meisler *et al.*, 2008; de Munck *et al.*, 2013b). En muestras de médula espinal procedentes de pacientes con ELA esporádica, se ha visto que existe una fragmentación del AG en motoneuronas del asta anterior (Mourelatos *et al.*, 1990; Gonatas *et al.*, 1992; Stieber *et al.*, 1998; Fujita y Okamoto, 2005). Además, se ha encontrado que dicha fragmentación consiste en una pérdida de la configuración normal del AG, en este caso las cisternas dejan de estar conectadas unas con otras (Gonatas *et al.*, 1992).

Por otro lado, se ha propuesto que la fragmentación del AG está íntimamente asociada con el estrés del retículo endoplásmico sugiriéndose que estos dos eventos pueden estar relacionados en la patología de la ELA (Nakagomi *et al.*, 2008; Walker y Atkin 2011).

En resumen, la afectación de la vía secretora en las enfermedades neurodegenerativas converge en un mal plegamiento de las proteínas en el RE posiblemente debido a: 1) un daño en la maquinaria de degradación proteica asociada al RE, 2) una funcionalidad de la red de chaperonas alterada, 3) una oxidación local de proteínas en el RE, 4) una posible interrupción del tráfico vesicular, 5) una estructura del citoesqueleto alterada, 6) la presencia de fragmentación en la estructura del AG, 7) una alteración en la actividad lisosomal, o autofágica. Todos estos eventos sugieren la importancia de la vía secretora en las proteinopatías presentes en muchas enfermedades neurodegenerativas, pudiendo ser una importante diana para el tratamiento de las mismas (Nassif *et al.*, 2010).

## **5.5. Análisis de biomarcadores de neurodegeneración**

### **5.5.1. Análisis de GSK3**

En el presente estudio, hemos encontrado que el L-BMAA en las células SH-SY5Y (Figura 25), en el cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA (Figura 35) y en los cortes incubados con el aminoácido (Figura 47) produce un incremento de GSK3 $\beta$  en el extracto total, y aún es más señalado este incremento en la fracción nuclear sin producirse un descenso de los niveles citosólicos en ninguno de los tres casos.

Cabe destacar, que daños que inducen muerte celular pueden causar una acumulación de GSK3 $\beta$  en el núcleo antes de que se produzca la activación de la cascada de caspasas

(Bijur y Jope, 2001). Esta acumulación de GSK3 $\beta$  en el núcleo desencadenaría procesos de muerte celular de acuerdo con lo descrito por de Munck *et al.* (2013b), que demuestran que, en ratas tratadas con L-BMAA, el análisis de microscopía electrónica indica un marcaje positivo para caspasa-3 en la zona perinuclear de neuronas motoras de médula espinal.

Por otra parte, se ha descrito previamente, que GSK3 $\beta$  puede jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer entre otras enfermedades neurodegenerativas (Kremer *et al.*, 2011; Valvezan y Klein, 2012). Así, GSK3 $\beta$  está implicada en la fosforilación normal y patológica de tau (Balaraman *et al.*, 2006). Además, se ha demostrado un incremento de los niveles de GSK3 $\beta$  en corteza frontal y temporal en afectados de ELA con dificultades cognitivas (Yang W. *et al.*, 2008).

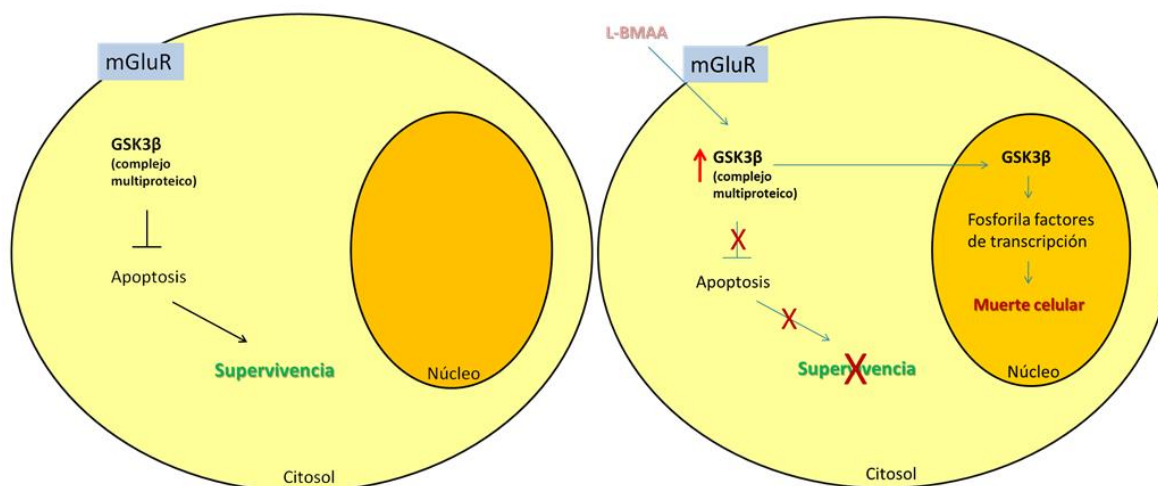
La enzima GSK3 posee dos isoformas, GSK3 $\alpha$  y GSK3 $\beta$ , que son inactivadas por fosforilación en la Ser 21, el caso de la isoforma GSK3 $\alpha$  y en la Ser 9 en el caso de GSK3 $\beta$  (Sutherland *et al.*, 1993). Hay que tener en cuenta que GSK3 se encuentra activa de manera constitutiva, es ubicua y es esencial para la vida como se ha demostrado en múltiples estudios (Hur y Zhou, 2010). Además, las alteraciones en los niveles de expresión de GSK3 durante el desarrollo, han sido propuestas como un posible factor de riesgo que incrementa la vulnerabilidad para padecer enfermedades psiquiátricas (Hur y Zhou, 2010; Beurel *et al.*, 2012). Por otro lado, la alteración de la actividad de GSK3 en el cerebro influencia negativamente la estructura neuronal, pudiendo quedar afectado el mantenimiento de los circuitos neuronales encargados de la función cognitiva (Salcedo-Tello *et al.*, 2011).

GSK3 $\beta$  ha sido establecida como una enzima reguladora antiapoptótica para la vía de muerte celular extrínseca por apoptosis, pero este efecto protector solo se lleva a cabo cuando GSK3 $\beta$  se localiza en el citosol (Beurel y Jope, 2006). Por ello, bajo condiciones basales, GSK3 $\beta$  es mayoritariamente citosólico y se asocia con complejos multiproteicos que son sus sustratos (Meares y Jope, 2007). Tras la estimulación, GSK3 $\beta$  es liberado desde las proteínas de anclaje y se transloca al núcleo, donde produce muerte celular (Bijur y Jope, 2001). Para ser translocado al núcleo, es necesario que GSK3 $\beta$  sea liberado desde sus anclajes citoplásmicos y que sea fosforilado en la tirosina 216, así ya es apto para ser translocado al núcleo gracias a su secuencia de localización nuclear y su cola N-terminal (Meares y Jope, 2007). Una vez en el núcleo,

GSK3 $\beta$  regula importantes funciones celulares debido a las fosforilaciones que lleva a cabo en numerosos factores de transcripción (Sakamaki *et al.*, 2012).

La translocación nuclear de GSK3 $\beta$ , se observa de manera más patente, en la Figura 36 correspondiente a la inmunofluorescencia panorámica de las crestas cerebelares marcadas con anti-GSK3 $\beta$ , apareciendo más intensidad de marcaje en la zona de núcleos de las crestas cerebelares, en el caso de los animales tratados con L-BMAA comparando con los controles. Además, los resultados descritos en este trabajo, indican que la toxicidad del L-BMAA implica un incremento de la expresión de GSK3 $\beta$ .

Podemos concluir por tanto, que en respuesta al tratamiento con L-BMAA de las células SH-SY5Y, del cerebelo de ratas tratadas *in vivo* y de los cortes de cerebelo incubados con el aminoácido neurotóxico, GSK3 $\beta$  es translocada al núcleo, contribuyendo al proceso de muerte celular (Figura 53).



**Figura 53.** Esquema explicativo de la producción de muerte neuronal ocasionada por la translocación del GSK3 $\beta$  desde el citosol al núcleo bajo la exposición celular al L-BMAA.

Con respecto al incremento nuclear de GSK3 $\alpha$  visualizado en las células SH-SY5Y tratadas con L-BMAA (Figura 25), se ha descrito que una acumulación nuclear de esta isoforma media desórdenes neurológicos que incluyen la enfermedad de Alzheimer (Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011). Por ello, teniendo en cuenta nuestros resultados, es tentador especular que GSK3 $\alpha$  juegue un papel en la muerte celular causada por el tratamiento con L-BMAA.

### 5.5.2. Análisis de TDP-43

Por otro lado, queremos destacar que TDP-43 juega un papel importante en la patogénesis de las enfermedades que afectan a las motoneuronas y en la degeneración del lóbulo frontotemporal, siendo una de las moléculas en las que se ha centrado la investigación durante los últimos años (Liscic *et al.*, 2008; Igaz *et al.*, 2011).

En las células SH-SY5Y, tras la incubación con L-BMAA hemos demostrado que aparecen incrementados, significativamente, los valores de TDP-43 fosforilado (Figura 26). Estos datos se corresponden con los obtenidos por Arai *et al.* (2009) para corteza temporal, giro dentado, amígdala e hipocampo correspondiente a enfermos de Alzheimer y de demencia con cuerpos de Lewy.

Nuestros experimentos (Figura 26) indican que las células de neuroblastoma tratadas con L-BMAA presentan un incremento de las formas aberrantes de TDP-43, similares a las encontradas en los casos de agregados patológicos que aparecen en algunas enfermedades neurodegenerativas. La generación del fragmento C-terminal, de entre 25 y 35 KDa, puede impedir que TDP-43 se localice en el núcleo (Zhang *et al.*, 2009; Arai *et al.*, 2010; Nishimoto *et al.*, 2010). Por ello, se podría especular que las proteínas mal plegadas o fragmentadas de TDP-43 pueden formar agregados relacionados con el daño neuronal. Hay estudios que relacionan la presencia de inclusiones citoplásmicas que contienen el fragmento C-terminal de TDP-43 con una alteración del transporte, dado que afecta a la estructura de los microtúbulos (Pesiridis *et al.*, 2011). Esta fragmentación de TDP-43 se lleva a cabo por caspasas cuya diana se encuentra en el dominio C-terminal de la proteína (Zhang *et al.*, 2007).

En cuanto a los resultados obtenidos para el tejido correspondiente a los tratamientos *in vivo* con el aminoácido neurotóxico y para los cortes de cerebelo incubados con L-BMAA (Figuras 37 y 48), se observa un significativo incremento de las formas de alto peso molecular de TDP-43 pero no se han podido detectar los fragmentos correspondientes al extremo C-terminal hallados en el caso del tratamiento de las células SH-SY5Y con L-BMAA, aunque sí queda patente la aparición de formas de alto peso molecular en el citosol.

Por otra parte, estudios previos demuestran la presencia de inclusiones de TDP-43 en el cerebelo de pacientes con proteinopatías de TDP-43. En ellos, aparecen estas

inclusiones en la capa de neuronas de Purkinje (King *et al.*, 2011). Estos datos apoyan los resultados que hemos obtenido por microscopía electrónica (Figura 39), en los que se aprecian niveles de TDP-43 citoplásmicos elevados, formando agregados en neuronas de Purkinje de los animales tratados. Teniendo en cuenta este resultado, podemos concluir que las formas de alto peso molecular halladas para TDP-43, en los western blot del cerebelo de animales a los que se les inyectó L-BMAA, se corresponde con un incremento de su expresión y con la formación de agregados citoplásmicos de TDP-43 que han sido visualizados por microscopía electrónica (Liscic *et al.*, 2008).

TDP-43 es un marcador histopatológico de ELA y de demencia frontotemporal (Arai *et al.*, 2006; Neumann *et al.*, 2007), así como de otros múltiples desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Amador-Ortiz *et al.*, 2007; Josephs *et al.*, 2013), la enfermedad de Huntington (Schwab *et al.*, 2008), la esclerosis hipocampal (Amador-Ortiz *et al.*, 2007), y la demencia con cuerpos de Lewy (Lin y Dickson, 2008).

La sobreexpresión y las alteraciones registradas en TDP-43 en los pacientes con ELA han conducido a la creación de una nueva clasificación para cada una de las proteinopatías de TDP-43 (Mackenzie *et al.*, 2010). Además, se han descubierto una gran cantidad de mutaciones que afectan al gen que codifica para TDP-43 (gen TARDBP), y que pueden producir fenotipos patológicos de ELA (Pesiridis *et al.*, 2009). Así, la aparición de formas aberrantes de TDP-43 ha sido asociada con mutaciones en esta proteína (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010).

Hace algunos años, se publicó que el L-BMAA se une a proteínas, dado que puede unirse al ARN de transferencia de la serina e incorporarse como parte de la cadena proteica (Holtcamp, 2012). Esta incorporación errónea del L-BMAA puede conducir a alteraciones en las estructuras proteicas generando proteínas mal plegadas en los individuos genéticamente susceptibles. Además, las neuronas son extremadamente sensibles a dichas proteínas, posiblemente porque esas especies potencialmente tóxicas no se pueden diluir ya que en las neuronas no hay división celular (Cox, 2009; Dunlop y Rodger, 2011; Rodgers y Dunlop, 2011). Merece la pena destacar, que Pablo *et al.* (2009) confirmaron esta unión a proteínas del L-BMAA en el cerebro de pacientes con Alzheimer y pacientes con ELA. Por otra parte, se sabe que existe una influencia de la

exposición ambiental y de la predisposición genética para que se produzcan enfermedades relacionadas con la acumulación de L-BMAA (Vance *et al.*, 2010).

Además, estas proteinopatías aparecen caracterizadas bioquímicamente por las inclusiones de TDP-43 anormalmente fosforilado y formando fragmentos que contienen su extremo C-terminal. Estas inclusiones además contienen ubiquitina y son insolubles (Liscic *et al.*, 2008). Estos datos se corresponden con los obtenidos para modelos animales genéticos en los que TDP-43 aparece tanto fosforilado como fragmentado (Tsai *et al.*, 2010). Se han desarrollado modelos celulares con mutaciones en TDP-43 que dan lugar a los fragmentos C-terminales, para llevar a cabo estudios de agregación e investigar la presencia de los mismos, en las inclusiones citoplásmicas de enfermedades neurodegenerativas (Nonaka *et al.*, 2009; Budini *et al.*, 2012; Muñoz-Sáez *et al.*, 2013).

Además, TDP-43 y otras proteínas mal plegadas pueden ser ubiquitinizadas como respuesta biológica normal a la modificación aberrante de proteínas. Hay que tener en cuenta que la presencia de inclusiones ubiquitinizadas es representativa de la patología presentada por la mayoría de enfermedades neurodegenerativas (Yamamoto, y Simonsen, 2011) y TDP-43 es el componente característico mayoritario de estas inclusiones (Lee E.B. *et al.*, 2011).

Las proteinopatías de TDP-43 son caracterizadas por inclusiones neuronales de TDP-43 ubiquitinizado en el citoplasma, inclusiones intranucleares, neuritas distróficas y en algunos casos de enfermedades de las motoneuronas aparecen inclusiones citoplásmicas en células gliales (Liscic *et al.*, 2008). Hay estudios que demuestran que la inhibición del proteasoma en neuronas corticales induce a la acumulación de TDP-43 en el citoplasma e incrementa su insolubilidad, teniéndose que valorar la presencia de TDP-43 en la fracción insoluble de proteínas (Van Eersel *et al.*, 2011). Este estudio está de acuerdo con los resultados que hemos obtenido en nuestro laboratorio sobre TDP-43, ya que hemos tenido que valorar esta proteína mediante una extracción de la fracción insoluble proteica utilizando tampón de urea. Cuando se realizó una extracción de proteínas soluble no se obtuvieron cantidades significativas de TDP-43 (datos no mostrados). Existen modelos animales con alteraciones genéticas que presentan TDP-43 mutado en los que se observa fragmentación en TDP-43, niveles incrementados de ubiquitina en citosol y en núcleo y agregados intranucleares y citoplásmicos, inmunopositivos para TDP-43, que se visualizan mediante inmunohistoquímica (Xu *et*

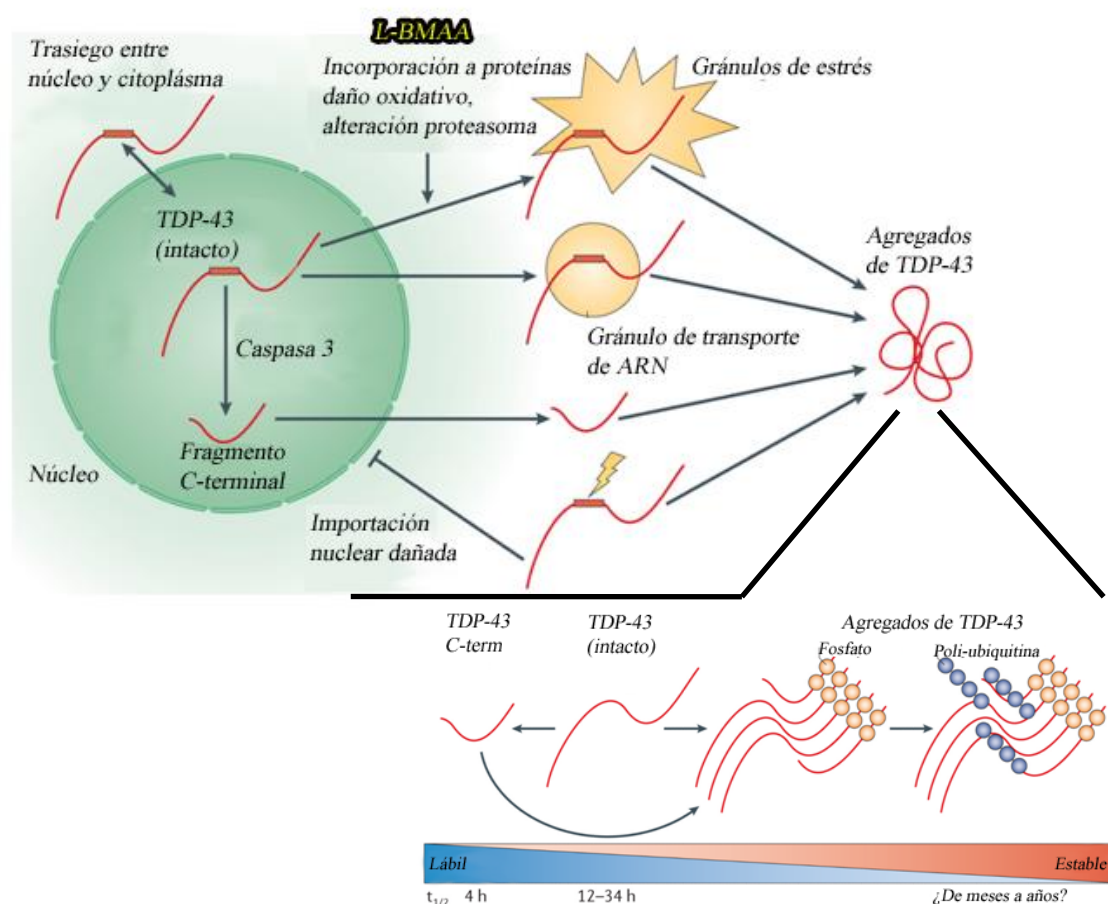
*al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2010). Estos datos son compatibles con los obtenidos en el presente trabajo para el cerebelo de animales tratados con L-BMAA en los que se observan estas alteraciones tanto por microscopía electrónica como por inmunohistoquímica de fluorescencia (Figura 38). Además, los animales mutantes para TDP-43 presentan una disfunción motora progresiva tal y como hemos observado en nuestras ratas tratadas con L-BMAA (Figura 33). (Tsai *et al.*, 2010; Stallings *et al.*, 2010; de Munck *et al.*, 2013b).

La mayoría de los estudios de TDP-43 realizados en el sistema nervioso central de modelos animales transgénicos muestran alteraciones y aberraciones de TDP-43, son trabajos realizados en cerebro, y están centrados en corteza motora y médula espinal (Miki *et al.*, 2010). Hasta el momento no se habían estudiado estas alteraciones en el cerebelo.

La formación de gránulos de estrés debido a la acumulación indebida de TDP-43, ha sido estudiada en profundidad como una de las causas principales por las cuales las alteraciones en dicha proteína producen neurodegeneración (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010; Dewey *et al.*, 2012). Algunos autores publican la aparición de niveles incrementados de TDP-43 en el RE rugoso, de las motoneuronas de médula espinal de pacientes con ELA esporádica, en comparación con los controles (Sasaki *et al.*, 2010). Se ha descrito en la bibliografía que el incremento de TDP-43 localizado en el RE en motoneuronas con ELA, se correlaciona con la disminución de su localización nuclear, sugiriendo que TDP-43 puede redistribuirse al RE en la enfermedad (Sasaki *et al.*, 2010). Esta localización ectópica de TDP-43 en el RE no ha sido visualizada en nuestros experimentos.

Cómo contribuye TDP-43 al proceso neurodegenerativo no está muy claro, aunque se han propuesto varias hipótesis (Dewey *et al.*, 2012; Robberecht y Philips, 2013) (Figura 54). Por un lado, un incremento de TDP-43 en el citoplasma resulta tóxico, así como también resulta negativo el descenso de TDP-43 en el núcleo. La pérdida de función nuclear se debe al secuestro de TDP-43 en las inclusiones citoplásmicas. Esta hipótesis es atractiva porque TDP-43 reconoce a miles ARNs, incluyendo ARNs específicos neuronales implicados en desórdenes neurodegenerativos. Además, la perturbación del TDP-43 endógeno nuclear, da como resultado una pérdida de las funciones normales de TDP-43 y a afecta a vías de señalización reguladoras, como NF- $\kappa$ B (Swarup *et al.*,

2011), culminando en la degeneración selectiva de neuronas vulnerables (Igaz *et al.*, 2011). Sin embargo, el incremento citoplásmico de TDP-43, debido a su sobreexpresión y a la agregación, resulta tóxico para una amplia variedad de células, desde organismos más sencillos como las levaduras (Johnson *et al.*, 2008) hasta las células de mamíferos (Winton *et al.*, 2008).



**Figura 54:** Localización subcelular de TDP-43. TDP-43 se encuentra preferentemente en el núcleo, aunque existe un trasiego entre el núcleo y el citoplasma ya que tiene una secuencia de localización nuclear en su estructura (representado por el cuadrado rojo). La acumulación de TDP-43 en el citoplasma puede ser inducida por una gran variedad de estresantes celulares como en nuestro caso es el L-BMAA. Estas inclusiones citoplásmicas forman agregados de TDP-43 en los que aparece el fragmento C-terminal de la proteína, así como TDP-43 fosforilado o ubiquitinizado. La vida media de TDP-43 en estos agregados es muy larga ya que el sistema de degradación proteica mediado por el proteasoma no funciona, así que se acumulan agregados proteicos de TDP-43 en citosol durante mucho tiempo. Cuando TDP-43 queda truncado y se forman los fragmentos del C-terminal, estos se translocan al citoplasma para ser degradados. El proceso de formación de los agregados de TDP-43 está estrechamente



*relacionado con la fosforilación y a continuación la ubiquitinización de la proteína. ( $t_{1/2}$ = vida media). Figura adaptada de Lee E.B. et al., 2011.*

Recientemente se ha establecido una correlación entre la presencia de TDP-43 y su acumulación en gránulos de estrés y GSK3, en las células SH-SY5Y. Moujalled *et al.* (2013) han descrito que inhibidores de GSK3 impiden la acumulación de TDP-43 en gránulos de estrés, posiblemente porque GSK3 está implicada en la funcionalidad del citoesqueleto, ya que fosforila a tau (Palomo *et al.*, 2011), con lo cual al inhibir GSK3 podría quedar dificultado el transporte de TDP-43 para su acumulación en dichos gránulos.

### **5.6. Procesos autofágicos desencadenados por el tratamiento con L-BMAA**

Hay muchas evidencias firmemente establecidas sobre la importancia de la autofagia neuronal en condiciones normales y patofisiológicas en el cerebro (Son *et al.*, 2012).

En nuestros experimentos, observando la ultraestructura celular de las neuronas de Purkinje por microscopía electrónica, hemos visualizado señales que indican un incremento de la autofagia en las neuronas del cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA. La Figura 40 muestra los distintos pasos de la formación de autofagosomas. En la mayoría de los casos, en el interior del autofagosoma se pueden observar mitocondrias en distintos estadios de degeneración, con las crestas hinchadas o con las membranas mitocondriales alteradas. Estos datos se corresponden con los señalados por Yue *et al.*, (2002) en los que también se observan alteraciones ultraestructurales en las neuronas de Purkinje del ratón Lurcher. Como indican los western blot con anti-LC3 (Figura 41) y los experimentos de inmunohistoquímica (Figura 42) que realizamos con ratas control y tratadas con L-BMAA, el tratamiento con el aminoácido produce un significativo incremento de LC3. De estos resultados podemos concluir, que en nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con L-BMAA produce alteraciones celulares que desencadenan procesos autofágicos en las neuronas cerebelares de las ratas tratadas.

Otros autores han demostrado que los agregados citoplásmicos de TDP-43, como los que hemos hallado en el cerebelo de animales tratados con L-BMAA del presente trabajo (Figura 39), colocalizan con LC3 y con la proteína adaptadora p62. Además, la

sobreexpresión de esta proteína adaptadora reduce la agregación de TDP-43 de manera dependiente del proteasoma y de la autofagia (Chen *et al.*, 2012).

La formación de las vacuolas autofágicas se produce en paralelo con la degradación proteica. Los errores en el control de calidad de las proteínas y de los orgánulos en el soma neuronal, en los axones y en las sinapsis alteran la función normal de las neuronas. La prevalencia de la autofagia en neuronas puede ser atribuida a la falta de división celular, que contribuye al desarrollo de mitocondrias disfuncionales y a la formación de agregados proteicos presentes en la enfermedad de Alzheimer, en el Parkinson, en el Huntington y en la ELA que, en último término, conducen a la muerte neuronal (Nagley *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2012). Bajo condiciones patológicas, la tasa de formación de las vacuolas autofágicas puede exceder a la tasa de degradación produciendo el estrés autofágico (Chen *et al.*, 2012). Este estrés autofágico ha sido reconocido como una de las principales causas de neurodegeneración, ya que se trata de un proceso fundamental para la supervivencia neuronal. En otras palabras, defectos en la iniciación y estados de maduración del proceso autofágico así como desequilibrios entre la inducción y el aclaramiento de autofagosomas desarrollan, en conjunto, el estrés autofágico. Bajo estas condiciones, las neuronas son más susceptibles a daños medioambientales o genéticos que afectan a su integridad (Chen *et al.*, 2012).

Este proceso ha sido ampliamente estudiado monitorizando el reclutamiento de estas vesículas por la proteína de cadena ligera asociada a los microtúbulos 3 (LC3), como un componente esencial de la membrana del autofagosoma (Kabeya *et al.*, 2000). Debido a la naturaleza post-mitótica de las neuronas se suele enfatizar la autofagia como proceso fundamental en estas células para mantener la homeostasis de los orgánulos funcionales, como las mitocondrias por ejemplo. Hay al menos dos rutas implicadas en el desarrollo de la autofagia que desencadena la muerte neuronal. En primer lugar, cuando el proceso autofágico es insuficiente para enfrentarse a los agregados proteicos tóxicos y en segundo lugar, la sobre-regulación de la autofagia que contribuye directamente a la muerte celular. Por ello, se añade mucha más complejidad al proceso habiendo una importante interacción entre las vías autofágicas y apoptóticas (Nagley *et al.*, 2010).

La acumulación de TDP-43 con una estructura alterada, como son sus formas de alto peso molecular o la presencia de los fragmentos C-terminales (Figuras 26 y 37) en el cerebelo de ratas tratadas con L-BMAA, indican que existe una disfunción en los

sistemas de degradación de proteínas intracelulares que puede estar implicada en la patología. Estudios recientes muestran que la inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma o la inhibición de la autofagia incrementan de manera destacable la agregación de TDP-43, lo que sugiere que esta proteína puede ser degradada por ambos sistemas (Wang *et al.*, 2010). Por otra parte, se han realizado estudios por medio de los cuales se sabe que, una activación de la autofagia resulta protectora frente a las proteinopatías de TDP-43, como ocurre en la demencia frontotemporal, siendo así un mecanismo de defensa de las células ante la acumulación de proteínas aberrantes (Wang *et al.*, 2012).

Los agregados proteicos y los orgánulos dañados incorporados en autofagosomas en los axones tienen que ser transportados hacia el soma para encontrarse con los lisosomas, este hecho es otra importante característica de la autofagia neuronal. En células de Purkinje del ratón Lurcher la excitotoxicidad desencadena la acumulación de autofagosomas en hinchamientos axonales distróficos, visualizados mediante LC3 conjugado con GFP (*Green Fluorescein Protein*) como un punto clave de las axonopatías del sistema nervioso central (Wang Q.J. *et al.*, 2006). En este mismo modelo en ratón, se ha visto que la activación de la autofagia en las células de Purkinje media la muerte celular *in vivo* (Yue *et al.*, 2002).

Otra posible hipótesis para explicar el incremento de la autofagia encontrada en cerebelo de los animales tratados con L-BMAA, es que dado que este aminoácido produce un incremento de GSK3 $\beta$ , y que esta enzima actúa sobre la vía de señalización de PI3K/Akt inhibiéndola, puede influir en el proceso de formación del autofagosoma (Ferrucci *et al.*, 2011). Las moléculas de señalización PI3K clase I/Akt se unen al receptor tirosina quinasa y activan mTOR y éste reprime la autofagia en respuesta a señales similares a insulina y a otros factores de crecimiento (Lum *et al.*, 2005; Ferrucci *et al.*, 2011). Ya que, en nuestro caso, el tratamiento con L-BMAA produce un incremento de GSK3  $\beta$ , se podría especular que GSK3 $\beta$  estuviera inhibiendo a PI3K, favoreciendo así los procesos autofágicos.

Por todo lo expuesto anteriormente, queda claro que el L-BMAA incrementa la autofagia, pudiendo esto ser fundamental para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. (Son *et al.*, 2012; Ghavami *et al.*, 2014).

### 5.7. Estudios de neuroprotección frente al tratamiento con L-BMAA

En la última parte de este estudio, se abordó el análisis de los efectos de distintas moléculas que, por su naturaleza, composición y por las dianas específicas de las mismas, podrían tener potencial terapéutico, previniendo de los daños que causa el L-BMAA sobre las células de neuroblastoma, en las ratas tratadas con L-BMAA y sobre los cortes de cerebelo incubados con el aminoácido.

Dada la importancia del papel de la CK-1 durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y a la vista de los efectos del L-BMAA sobre la viabilidad celular, se realizó un cribado con IGS2.7, IGS2.55, IGS2.44 y DIP5.5, todos ellos inhibidores de CK-1, diseñados en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por el grupo de investigación dirigido por la Dra. Ana Martínez, la cual ha mostrado un gran interés por llevar a cabo los ensayos con estas moléculas potencialmente terapéuticas. Todas ellas son moléculas heterocíclicas de bajo peso molecular y son permeables a barrera hematoencefálica. El IGS2.7, el IGS2.55, el IGS2.44 pertenecen al grupo de los benzotiazoles y el DIP5.5 pertenece a los imidazoles. En todos los casos se obtuvo una disminución de la muerte celular al suministrar estos inhibidores junto con el tratamiento de las células SH-SY5Y con L-BMAA (Figura 27).

Por otro lado, nos ha parecido interesante evaluar otras moléculas neuroprotectoras como la taurina, dado que actúa disminuyendo la excitotoxicidad y reduciendo el incremento de calcio intracelular inducidos por glutamato (Wu y Prentice, 2010). Dado que hemos visto como el L-BMAA provoca un incremento de los niveles de calcio mitocondrial en cultivos de neuroblastoma humano, ensayamos este neuroprotector, obteniéndose resultados prometedores que reafirman dicho papel (Figura 27). Así, cuando las células se trataron con L-BMAA y taurina, la taurina resultó tener un efecto protector impidiendo la disminución de viabilidad celular causada por el tratamiento con L-BMAA.

Teniendo en cuenta que las células de neuroblastoma, tratadas con L-BMAA presentan un incremento en los niveles de GSK3 $\beta$ , de los agregados de TDP-43 y que resultan sensibles a la actuación de inhibidores de GSK3 y de CK1, así como de otros protectores como la taurina, se podría proponer a estos cultivos tratados con L-BMAA

como un modelo celular para el estudio de los mecanismos de protección en procesos de neurodegeneración.

En los últimos años, se ha investigado el uso de inhibidores de GSK3 para el tratamiento de diferentes enfermedades neurodegenerativas. La actividad basal de GSK3 está regulada por múltiples mecanismos de acción diferentes incluyendo, la fosforilación en diferentes residuos (conduciéndose a la inactivación o la superactivación de las funciones enzimáticas), las interacciones proteína-proteína, y la inhibición de péptidos endógenos (Xu *et al.*, 2009). Sin embargo, no es posible modular a la baja la actividad de GSK3 con un mecanismo de acción endógeno alternativo cuando la enzima se sobre-expresa en diferentes condiciones patológicas, como la enfermedad de Alzheimer y otros desordenes neurodegenerativos. Por tanto, una inhibición leve de GSK3 puede ser suficiente para recuperar los niveles de actividad enzimática a los niveles basales produciéndose un importante efecto terapéutico (Medina y Avila, 2010; Martínez *et al.*, 2011). Con el tratamiento con inhibidores de GSK3, se persigue el devolver a la enzima a sus niveles basales. Como en nuestro caso hemos visto un incremento de los niveles de la isoforma GSK3 $\beta$  en los tres sistemas ensayados bajo el tratamiento con L-BMAA, hemos creído oportuno realizar un estudio probando moléculas potencialmente terapéuticas que puedan impedir el incremento de GSK3 $\beta$  en dichos sistemas.

El ácido isolecanórico (Sakurai y Goto, 1987) es un producto natural aislado por primera vez del líquen *Parmelia tinctorum*. La biosíntesis del ácido isolecanórico está encuadrada dentro de la ruta de los policétidos polifenólicos, formando parte del subgrupo de los llamados orto-dépsidos.

Nuestros resultados muestran que el ácido isolecanórico es capaz de disminuir la muerte provocada por el L-BMAA en las células SH-SY5Y (Figura 30). Dado que se trata de un inhibidor de GSK3, y que GSK3 se ha visto directamente relacionada con procesos neurodegenerativos, cabe esperar que esta molécula actúe de manera protectora. Además, esta molécula es un inhibidor no competitivo del sitio del sustrato con GSK3 $\beta$ . El ácido isolecanórico se comporta como un inhibidor competitivo del sitio del ATP como todos los inhibidores conocidos de CK-1  $\delta$ , en parte motivado por la teórica inexistencia de otras cavidades de unión que permitan una unión alostérica. Otros estudios han demostrado que el ácido isolecanórico es capaz de proteger el daño

mitocondrial inducido por el L-BMAA y mantener estable el potencial de membrana mitocondrial, lo que permite reducir el daño inducido por la toxina (Cantizani, 2013).

El VP2.51 pertenece al grupo de los tiazoles y es un inhibidor reversible de GSK3 ATP competitivo. Al igual que los anteriores también se sabe que es permeable a la barrera hematoencefálica. Los estudios *in vitro*, llevados a cabo con cortes de cerebelo en el presente trabajo, indican que al administrar este inhibidor junto con el L-BMAA, la muerte celular provocada por el aminoácido, medida por liberación al medio de LDH, resulta parcialmente disminuida (Figura. 49). Al encontrarse la actividad de GSK3 íntimamente relacionada con la muerte celular, es lógico pensar que al inhibirla se produce un incremento de viabilidad y por consiguiente un efecto neuroprotector.

En el inicio para el estudio del posible efecto neuroprotector del VP2.51, se analizó proceso de autofagia y los resultados indicaron que las ratas tratadas con L-BMAA, que posteriormente fueron tratadas con VP2.51, muestran una disminución del marcaje de LC3 en las neuronas de Purkinje, respecto del observado en las ratas sólo tratadas con L-BMAA, por lo tanto, el tratamiento con VP2.51 resultó ser protector (Figuras 43 y 44). Estas observaciones apoyan fuertemente la posibilidad de la implicación de GSK3 en la autofagia provocada por L-BMAA.

El estudio del papel neuroprotector del VP2.51 es un tema abierto que requiere de un estudio en profundidad en todos los aspectos relacionados con la neurodegeneración.

### **5.8. La S1P como neuroprotector**

La esfingosina 1-fosfato ha sido calificada como un importante regulador de la muerte celular y la supervivencia. En este sentido, este esfingolípido induce diferenciación neuronal en las células de neuroblastoma (Lee J.H. *et al.*, 2011).

Las células SH-SY5Y que han sido tratadas con L-BMAA y con S1P ponen de manifiesto que el esfingolípido protege de la muerte celular provocada por el tratamiento con el aminoácido neurotóxico (Figura 28). Previamente se ha descrito que, en las células SH-SY5Y, la muerte es señalizada por un incremento de la ceramida, ceramida fosfato o esfingosina llevada a cabo a través de la vía de p38MAPK, mientras que la supervivencia requiere MAPK y un ratio alto de S1P/ceramida (Tavarini *et al.*, 2000).

Se obtuvieron resultados similares cuando analizamos la viabilidad celular de los cortes de cerebelo tratados con S1P además de con L-BMAA (Figura 49). Al profundizar en el estudio de la muerte celular para conocer el mecanismo de protección de la S1P, encontramos que esta molécula da lugar a una disminución de la necrosis, concomitante con un aumento de la apoptosis. Teniendo en cuenta la alta agresividad de la necrosis para los tejidos, en comparación con la apoptosis, podríamos predecir, en estos resultados, un efecto protector del esfingolípido (Figura 29).

Hay múltiples estudios que sugieren que la S1P es un agente neuroprotector actuando por ejemplo sobre los daños cerebrales causados por un proceso isquémico. En este caso la S1P reduce la muerte neuronal, posiblemente mediante un mecanismo mediado por la PKC $\epsilon$ , por la reducción del calcio mitocondrial y por la afectación final del poro de transición mitocondrial (Miguel *et al.*, 2008; Agudo-López *et al.*, 2010a). Además se ha visto que la S1P puede inhibir procesos apoptóticos en respuesta a un estrés oxidativo elevado. Esta protección se lleva a cabo mediante la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt, y el efecto antiapoptótico se lleva a cabo mediante los receptores S1P1 y S1P3 (Nakahara *et al.*, 2012). Algunos estudios previos demuestran que el uso de agonistas del receptor de S1P genera un efecto neuroprotector frente a la isquemia cerebral debido a la activación de las vías de señalización de Akt y ERK (quinasas activadas por señales extracelulares) por la S1P, protegiendo de la apoptosis (Hasewaga *et al.*, 2010). Además, se sabe que a la dosis estudiada en el presente trabajo, 1  $\mu$ M, la S1P puede ser usada para producir diferenciación en células neuronales pudiendo ser un buen candidato para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Lee J.H. *et al.*, 2011). La esfingosina quinasa, encargada de fosforilar a la esfingosina para convertirla en S1P, tiene un papel dinámico en las células en respuesta al estrés, y media procesos de proliferación, apoptosis, autofagia y senescencia (Van Brocklyn y Williams, 2012). Se ha visto que las deficiencias en las enzimas implicadas en la síntesis de S1P y su acción pueden estar asociadas con defectos en importantes procesos celulares como por ejemplo la diferenciación neuronal y la apoptosis. Puede ser interesante ver si los animales mutantes para la síntesis de S1P muestran desórdenes neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson, que están asociados con una desregulación de la apoptosis (Pyne y Pyne, 2000). La implicación de la esfingosina quinasa-1 en la regulación de la muerte y la supervivencia de neuronas y el papel claramente apoptótico de la ceramida, refuerza la idea de que el biostato ceramida/S1P puede regular la vida y

la muerte de las neuronas. La capacidad de la esfingosina quinasa-1 de promover la supervivencia neuronal sugiere que los análogos de S1P son una estrategia para prevenir los síntomas de la enfermedad de Alzheimer (Gomez-Brouchet *et al.*, 2007). También se han realizado estudios en los que se ha usado la S1P como agente neuroprotector contra la encefalomiелitis obteniéndose resultados satisfactorios (Foster *et al.*, 2009). Otros estudios demuestran que la cascada de señalización de la S1P puede representar una nueva diana terapéutica para la malaria severa y cerebral (Finney *et al.*, 2011). La ausencia de la esfingosina quinasa-1 genera una muerte celular masiva en neuronas y progenitores así como la casi completa supresión de la proliferación celular en la población progenitora (Meng *et al.*, 2011) Se ha destacado también que la S1P tiene un papel importante en la regulación de la supervivencia celular durante el desarrollo del ganglio sensorial (Meng *et al.*, 2011).

Existen modelos de neuroprotección basados en la administración de litio, ya que se sabe que esta sal impide la desfosforilación de GSK3, promoviendo la supervivencia mediada por la vía PI3K/Akt e inhibiendo la apoptosis (Mora *et al.*, 2001). La S1P induce vías de señalización como las implicadas en la reorganización de la actina mediante proteínas Gi y la activación de PI3K/Akt, PKB/Akt y GSK3β (Lagadari *et al.*, 2009).

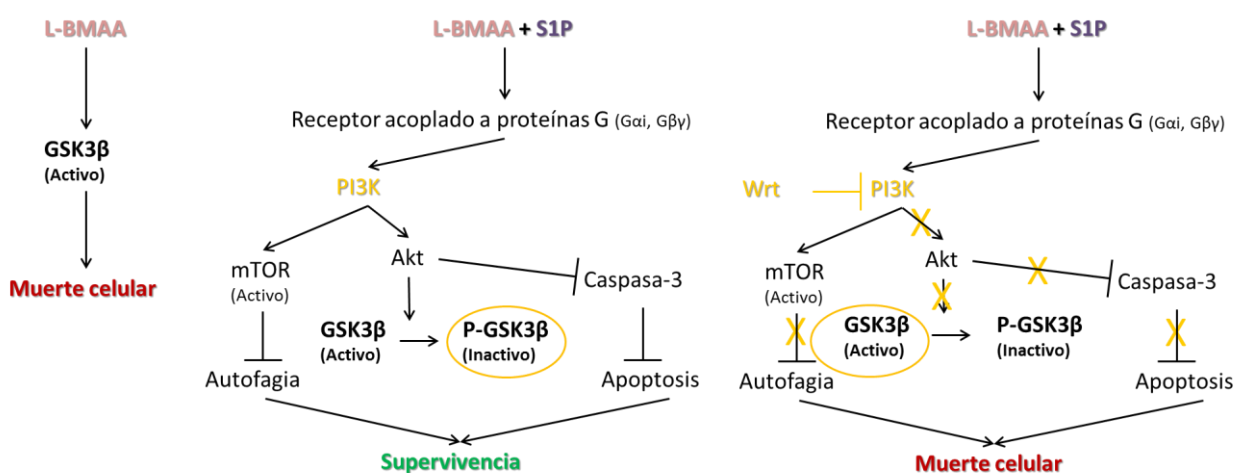
Por otro lado, nuestros resultados indican que la S1P protege del aumento de expresión de GSK3β producido por el L-BMAA, al igual que ocurre con el inhibidor de GSK3, tanto en las células como en los cortes de cerebelo incubados *in vitro* (Figuras 31 y 50). Para averiguar la vía por la cual la esfingosina protege de ese daño, se han realizado experimentos en presencia del inhibidor de PI3K, wortmanina (Figura 32). La inhibición de esta actividad enzimática evita el efecto protector de S1P, obteniéndose un incremento en GSK3β por acción del L-BMAA tanto en ausencia como en presencia del esfingolípido. Estos resultados nos conducen a pensar que la S1P protege de la subida de GSK3β provocada por el L-BMAA actuando sobre la vía de supervivencia de PI3K.

Además, cuando se procedió a la valoración de la forma inactiva de GSK3β, P-GSK3β (Ser 9), se encontró que con el tratamiento de S1P y L-BMAA se incrementa significativamente esta forma inactiva al comparar con el tratamiento solo con L-BMAA (Figura 32). Con el fin de averiguar si la S1P protege del incremento de la forma activa de GSK3β causado por la incubación con L-BMAA, hemos bloqueado uno



de los principales mecanismos reguladores de la actividad de GSK3 $\beta$ , que es PI3K. Al estar PI3K inhibida, en presencia de wortmanina, cuando incubamos con L-BMAA y S1P la PI3K no puede fosforilar a GSK3 $\beta$  y los niveles de P-GSK3 $\beta$  obtenidos son similares a los obtenidos cuando se incubaba solo con L-BMAA (Figura 32). Por tanto, podemos concluir que la S1P protege del incremento de GSK3 $\beta$  activo que causa el L-BMAA tanto desde el punto de vista de su síntesis como afectando a los mecanismos reguladores encargados de fosforilar a GSK3 $\beta$  para inactivarlo (Figura 55).

**Figura 55.** Esquema de la neuroprotección generada a través de PI3K por parte de la S1P



frente al aumento de GSK3 $\beta$  producido por el L-BMAA.

Por todo lo descrito anteriormente, el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas provocadas por la exposición al L-BMAA puede ser una realidad si se continúa la investigación y se profundiza en el estudio sobre los efectos de la administración de S1P como agente neuroprotector.

## **6. CONCLUSIONES**



## **Toxicidad del L-BMAA en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y**

1. El tratamiento con L-BMAA 10 mM en estas células produce un incremento de la muerte celular por necrosis y apoptosis. Los niveles de ROS son incrementados como respuesta a la excitotoxicidad causada por este aminoácido.
2. El L-BMAA produce alteraciones mitocondriales tales como la despolarización de la membrana mitocondrial y el aumento de calcio dentro de este orgánulo.
3. En respuesta al tratamiento con L-BMAA, GSK3 $\beta$  es translocada al núcleo, contribuyendo al proceso de muerte celular.
4. El L-BMAA produce un incremento de TDP-43, aumentando las formas aberrantes y los fragmentos C-terminales, de entre 25 y 35 KDa, característicos de algunas enfermedades neurodegenerativas.
5. En los ensayos de neuroprotección, las moléculas IGS2.7, IGS2.55, IGS2.44, DIP5.5 (inhibidores de CK-1), la taurina, el ácido isolecanórico (inhibidor de GSK3) y la S1P protegen de la muerte celular causada por el L-BMAA.
6. El papel neuroprotector de la S1P es llevado a cabo promoviendo una disminución de la necrosis. Además, la S1P protege del aumento de expresión de GSK3 $\beta$  producido por el L-BMAA, actuando sobre la vía canónica de supervivencia celular de PI3K/Akt, afectando tanto a la síntesis como a la fosforilación de GSK3 $\beta$ .

***Las células de neuroblastoma tratadas con L-BMAA, se podrían proponer como un modelo celular para el estudio tanto de los mecanismos de procesos neurodegenerativos, como para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas.***

### **Toxicidad del L-BMAA en cerebelo de ratas tratadas *in vivo***

1. En el cerebelo de los animales tratados con L-BMAA, las células de Purkinje presentan mitocondrias hinchadas, vacuolizadas y fragmentadas.
2. En las neuronas de Purkinje se observa una abundante fragmentación del retículo endoplásmico, un desanclaje de los ribosomas y una desestructuración del aparato de Golgi.
3. En respuesta al tratamiento con L-BMAA, en el cerebelo de ratas tratadas *in vivo*, GSK3 $\beta$  es translocada al núcleo, contribuyendo al proceso de muerte celular.
4. El tratamiento con L-BMAA produce un incremento de formas de alto peso molecular de TDP-43. Esta proteína aparece con una localización ectópica, formando agregados citosólicos, que generalmente aparecen ubiquitinizados.
5. En las neuronas de Purkinje el L-BMAA produce un aumento de los procesos autofágicos. El inhibidor de GSK3, VP2.51, es capaz de proteger de los procesos autofágicos que desencadena el aminoácido excitotóxico.

***Queda demostrado el daño cerebelar causado en ratas tras el tratamiento con L-BMAA. Las ratas afectadas no pueden reestablecer las funciones normales del cerebelo, con respecto a la coordinación motora y al control postural.***

### **Toxicidad del L-BMAA en cortes de cerebelo de rata**

1. El tratamiento con L-BMAA en cortes de cerebelo produce un incremento de la muerte celular.
2. El L-BMAA da lugar a la translocación de GSK3 $\beta$  al núcleo, contribuyendo al proceso de muerte celular.
3. La incubación con L-BMAA produce un incremento de TDP-43 y de formas aberrantes de alto peso molecular.
4. El inhibidor de GSK3, VP2.51 y la S1P protegen parcialmente de la muerte celular ocasionada en cortes de cerebelo por el L-BMAA. La S1P protege del aumento de expresión de GSK3 $\beta$  producido por el L-BMAA.

***Los cortes cerebelo tratados con L-BMAA constituyen un método sencillo y válido para el estudio tanto de mecanismos de procesos neurodegenerativos como para el ensayo de moléculas potencialmente terapéuticas.***



## **7. CONCLUSIONS**





**Toxicity of L-BMAA in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y**

1. The treatment with L-BMAA 10 mM in these cells leads to an increased cell death by necrosis and apoptosis. ROS levels are increased in response to this amino acid because it causes excitotoxicity.
2. L-BMAA produces mitochondrial abnormalities such as mitochondrial membrane depolarization and calcium increase in this organelle.
3. In response to L-BMAA treatment, GSK3 is translocated to the nucleus, where it is going to contribute to the cell death process.
4. L-BMAA causes an increased level of TDP-43, also increase the aberrant forms and the C-terminal fragments of between 25 and 35 KDa, which are a hallmark of some neurodegenerative diseases.
5. In the neuroprotective assays of molecules inhibitors IGS2.7, IGS2.55, IGS2.44, DIP5.5 (inhibitors of CK-1), taurine, isolecanoric acid (inhibitor of GSK3) and S1P, protect cell death caused by the L-BMAA.
6. The neuroprotective role of S1P is conducted to promote a decrease in necrosis. Furthermore, the increased GSK3 expression produced by the L-BMAA is protected by S1P, acting on the canonical cell survival pathway PI3K/Akt, and affecting both the synthesis and the phosphorylation of GSK3.

***Neuroblastoma cells treated with L-BMAA , could be proposed as a cellular model for studying mechanisms of both, neurodegenerative processes and for testing potential therapeutical molecules.***

### **Toxicity of L-BMAA in cerebellum of rats treated *in vivo***

1. In the cerebellum of animals treated with L-BMAA, Purkinje cells have swollen, vacuolated and fragmented mitochondria.
2. Abundant fragmentation of the endoplasmic reticulum, unanchored ribosomes and Golgi disorganization were observed in Purkinje neurons.
3. In the cerebellum of rats treated with L-BMAA *in vivo*, GSK3 is translocated to the nucleus, where contribute to the cell death.
4. Treatment with L-BMAA produces an increase in high molecular weight forms of TDP-43. This protein appears with an ectopic location, such as cytosolic aggregates, which usually appear ubiquitinated.
5. The L-BMAA in the Purkinje neurons produces an increased autophagic process. GSK3 inhibitor, VP2.51, can protect the autophagic process which is triggering by the excitotoxic amino acid.

***This work is an evidence of cerebellar damage in rats after treatment with L-BMAA. Rats affected cannot restore the normal functions of the cerebellum, regarding to motor coordination and postural control.***

### **Toxicity of L-BMAA in slices of rat cerebellum**

1. The treatment with L-BMAA in cerebellar slices causes an increased cell death.
2. The L-BMAA treatment results in the GSK3 translocation to nucleus, where contribute to the cell death.
3. Incubation with L-BMAA causes increased TDP-43 and high molecular weight aberrant forms from TDP-43.
4. Partially, both GSK3 inhibitor VP2.51 and S1P, protect cell death in cerebellum treated slices. S1P protects the increased expression of GSK3 produced by the L-BMAA.

***Cerebellum slices treated with L-BMAA provide a simple and valid method for the study of neurodegeneration mechanisms as well as an important tool for testing potential therapeutical molecules.***



## **8. BIBLIOGRAFÍA**



- Afifi A.K., Aleu F.P., Goodgold J., MacKay B. (1966). Ultrastructure of atrophic muscle in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*. 16 (5): 475-481.
- Agudo-López A., Miguel B.G., Fernández I., Martínez A.M. (2010a). Role of protein kinase C and mitochondrial permeability transition pore in the neuroprotective effect of ceramide in ischemia-induced cell death. *FEBS Lett*. 585 (1): 99-103.
- Agudo-López A., Miguel B.G., Fernández I., Martínez A.M. (2010b). Involvement of mitochondria on neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate in cell death in an in vitro model of brain ischemia. *Neurosci Lett*. 470 (2): 130-133.
- Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*. 48: 589-601.
- Almeida-Silva U.C., Hallak J.E., Júnior W.M., Osório Fde L. (2013). Association between spinocerebellar ataxias caused by glutamine expansion and psychiatric and neuropsychological signals - a literature review. *Am J Neurodegener Dis*. 2 (2): 57-69.
- Alonso M., Martinez A. (2004). GSK-3 inhibitors: discoveries and developments. *Curr Med Chem*. 11 (6): 755-763.
- Amador-Ortiz C., Lin W.L., Ahmed Z., Personett D., Davies P., Duara R., Graff-Radford N.R., Hutton M.L., Dickson D.W. (2007). TDP-43 immunoreactivity in hippocampal sclerosis and Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 61 (5): 435-445.
- Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 351 (3): 602-611.
- Arai T., Hasegawa M., Nonaka T., Kametani F., Yamashita M., Hosokawa M., Niizato K., Tsuchiya K., Kobayashi Z., Ikeda K., Yoshida M., Onaya M., Fujishiro H., Akiyama H. (2010). Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTL and



- other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathology*. 30 (2): 170-181.
- Arai T., Mackenzie I.R., Hasegawa M., Nonaka T., Niizato K., Tsuchiya K., Iritani S., Onaya M., Akiyama H. (2009). Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol*. 117 (2): 125-136.
- Atkin J.D., Farg M.A., Walker A.K., McLean C., Tomas D., Horne M.K. (2008). Endoplasmic reticulum stress and induction of the unfolded protein response in human sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*. 30 (3): 400-407.
- Ayala Y.M., Zago P., D'Ambrogio A., Xu Y.F., Petrucelli L., Buratti E., Baralle F.E. (2008). Structural determinants of the cellular localization and shuttling of TDP-43. *J Cell Sci*. 121 (Pt 22): 3778-3785.
- Azoulay-Alfaguter I., Yaffe Y., Licht-Murava A., Urbanska M., Jaworski J., Pietrovski S., Hirschberg K., Eldar-Finkelman H. (2011). Distinct molecular regulation of glycogen synthase kinase-3alpha isozyme controlled by its N-terminal region: functional role in calcium/calpain signaling. *J Biol Chem*. 286 (15): 13470-13480.
- Babcock D.F., Hille B. (1998). Mitochondrial oversight of cellular  $Ca^{2+}$  signaling. *Curr Opin Neurobiol*. 8 (3): 398-404.
- Bacman S.R., Bradley W.G., Moraes C.T. (2006). Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: Trigger or target? *Mol Neurobiol* 33: 113–131.
- Balaraman Y., Limaye A.R., Levey A.I., Srinivasan S. (2006). Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell Mol Life Sci*. 63 (11): 1226-1235.
- Banack S.A., Cox P.A. (2003). Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology*. 61 (3): 387-389.
- Banack S.A., Johnson H.E., Cheng R., Cox P.A. (2007). Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar Drugs*. 5 (4): 180-196.

- Barber S.C., Shaw P.J. (2010). Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med.* 48 (5): 629-641.
- Bastian A.J. (2011). Moving, sensing and learning with cerebellar damage. *Curr Opin Neurobiol.* 21 (4): 596-601.
- Beurel E., Joep R.S. (2006). The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol.* 79 (4): 173-189.
- Beurel E., Mines M.A., Song L., Joep R.S. (2012). Glycogen synthase kinase-3 levels and phosphorylation undergo large fluctuations in mouse brain during development. *Bipolar Disord.* 14 (8): 822-830.
- Bienfang P.K., Defelice S.V., Laws E.A., Brand L.E., Bidigare R.R., Christensen S., Trapido-Rosenthal H., Hemscheidt T.K., McGillicuddy D.J., Anderson D.M., Solo-Gabriele H.M., Boehm A.B., Backer L.C. (2011). Prominent human health impacts from several marine microbes: history, ecology, and public health implications. *Int J Microbiol.* 2011: 152815.
- Bijur G.N., Joep R.S. (2001). Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem.* 276 (40): 37436-37442.
- Bonnaud S., Niaudet C., Legoux F., Corre I., Delpon G., Saulquin X., Fuks Z., Gaugler M.H., Kolesnick R., Paris F. (2010). Sphingosine-1-phosphate activates the AKT pathway to protect small intestines from radiation-induced endothelial apoptosis. *Cancer Res.* 70 (23): 9905-9915.
- Bradford M.M.(1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley C.A., Peineau S., Taghibiglou C., Nicolas C.S., Whitcomb D.J., Bortolotto Z.A., Kaang B.K., Cho K., Wang Y.T., Collingridge G.L. (2012). A pivotal role of GSK-3 in synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci.* 5: 13.
- Brand L.E., Pablo J., Compton A., Hammerschlag N., Mash D.C. (2010). Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-

- methyamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae*. 9 (6): 620-635.
- Brown M.R., Sullivan P.G., Geddes J.W. (2006). Synaptic mitochondria are more susceptible to  $\text{Ca}^{2+}$  overload than nonsynaptic mitochondria. *J Biol Chem*. 281 (17): 11658-11668.
- Brownson D.M., Mabry T.J., Leslie S.W. (2002). The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J Ethnopharmacol*. 82 (2-3): 159-167.
- Budini M., Buratti E., Stuani C., Guarnaccia C., Romano V., De Conti L., Baralle F.E. (2012). Cellular model of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) aggregation based on its C-terminal Gln/Asn-rich region. *J Biol Chem*. 287 (10): 7512-7525.
- Buenz E.J., Howe C.L. (2007). Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology*. 28(3):702-704.
- Burnett G., Kennedy E.P. (1954). The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem*. 211: 969-980.
- Calabrese V., Boyd-Kimball D., Scapagnini G., Butterfield D.A. (2004). Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. *In Vivo*. 18 (3): 245-267.
- Calabrese V., Lodi R., Tonon C., D'Agata V., Sapienza M., Scapagnini G., Mangiameli A., Pennisi G., Stella A.M., Butterfield D.A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich's ataxia. *J Neurol Sci*. 233 (1-2): 145-162.
- Cantizani Pérez, Juan. (2013). Productos naturales como alternativa terapéutica frente a la Esclerosis Lateral Amiotrófica: El ácido isolecanórico. Tesis doctoral. Departamento de Biología de Sistemas, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid.
- Carriedo S.G., Sensi S.L., Yin H.Z., Weiss J.H. (2000). AMPA exposures induce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci*. 20 (1): 240-250.

- Chang Y.C., Chiu S.J., Kao K.P. (1993). beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats. *Chin J Physiol.* 36 (2): 79-84.
- Chauhan A., Chauhan V.P., Murakami N., Brockerhoff H., Wisniewski H.M. (1993). Amyloid beta-protein stimulates casein kinase I and casein kinase II activities. *Brain Res.* 629: 47–52.
- Chen K., Northington F.J., Martin L.J. (2010). Inducible nitric oxide synthase is present in motor neuron mitochondria and Schwann cells and contributes to disease mechanisms in ALS mice. *Brain Struct Funct.* 214 (2-3): 219-234.
- Chen S., Zhang X., Song L., Le W. (2012). Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol.* 22 (1): 110-116.
- Cherra S.J. 3rd, Chu C.T. (2008). Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: a question of balance. *Future Neurol* 3: 309–323.
- Chiò A., Benzi G., Dossena M., Mutani R., Mora G. (2005). Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain.* 128 (Pt 3): 472–476.
- Chiu A.S., Gehringer M.M., Braidy N., Guillemín G.J., Welch J.H., Neilan B.A. (2012). Excitotoxic potential of the cyanotoxin  $\beta$ -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicon.* 60 (6): 1159-1165.
- Chiu A.S., Gehringer M.M., Braidy N., Guillemín G.J., Welch JH, Neilan B.A. (2013). Gliotoxicity of the cyanotoxin,  $\beta$ -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Sci Rep.* 3: 1482.
- Chiu A.S., Gehringer M.M., Welch J.H., Neilan B.A. (2011). Does  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int J Environ Res Public Health.* 8 (9): 3728-3746.
- Chung M.J., Suh Y.L. (2002). Ultrastructural changes of mitochondria in the skeletal muscle of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ultrastruct Pathol.* 26 (1): 3-7.

- Chung Y.H., Joo K.M., Kim D.J., Kim S.S., Kim K.Y., Lee W.B., Cha C.I. (2008). Immunohistochemical study on the distribution of glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice. *Neurol Res.* 30 (9): 926-931.
- Cohen P., Yellowlees D., Aitken A., Donella Deana A., Hemmings B.A., Parker P.J. (1982). Separation and characterisation of glycogen synthase kinase 3, glycogen synthase kinase 4 and glycogen synthase kinase 5 from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 124, 21–35.
- Cole A.R. (2012). GSK3 as a Sensor Determining Cell Fate in the Brain. *Front Mol Neurosci.* 5: 4.
- Contardo-Jara V., Funke M.S., Peuthert A., Pflugmacher S. (2013).  $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine exposure alters defense against oxidative stress in aquatic plants *Lomariopsis lineata*, *Fontinalis antipyretica*, *Riccia fluitans* and *Taxiphyllum barbieri*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 88: 72-78.
- Costa J., Gomes C., de Carvalho M. (2010). Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 9 (6): 764-778.
- Cox P.A. (2009). Conclusion to the Symposium: the seven pillars of the cyanobacteria/BMAA hypothesis. *Amyotroph Lateral Scler.* 10 Suppl 2: 124-126.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J. (2003). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (23): 13380-13383.
- Cox P.A., Banack S.A., Murch S.J., Rasmussen U., Tien G., Bidigare R.R., Metcalf J.S., Morrison L.F., Codd G.A., Bergman B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (14): 5074-5078.
- Cox P.A., Richer R., Metcalf J.S., Banack S.A., Codd G.A., Bradley W.G. (2009). Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler.* 10 Suppl 2: 109-117.

- Cruz-Aguado R., Winkler D., Shaw C.A. (2006). Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 84 (2): 294-299.
- Cucchiaroni M.L., Viscomi M.T., Bernardi G., Molinari M., Guatteo E., Mercuri N.B. (2010). Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions of the cycad derivative beta-N-Methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J Neurosci.* 30 (15): 5176-5188.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996). Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800–803.
- Dawson R. Jr., Marschall E.G., Chan K.C., Millard W.J., Eppler B., Patterson T.A. (1998). Neurochemical and neurobehavioral effects of neonatal administration of beta-N-methylamino-L-alanine and 3,3'-iminodipropionitrile. *Neurotoxicol Teratol.* 20 (2): 181-192.
- de Munck E., Muñoz-Sáez E., Antonio M.T., Pineda J., Herrera A., Miguel B.G., Arahuetes R.M. (2013a). Effect of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat. *Environ Toxicol Pharmacol.* 35 (2): 193-199.
- de Munck E., Muñoz-Sáez E., Miguel B.G., Solas M.T., Ojeda I., Martínez A., Gil C., Arahuetes R.M. (2013b).  $\beta$ -N-methylamino-l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environ Toxicol Pharmacol.* 36 (2): 243-255.
- Dewey C.M., Cenik B., Sephton C.F., Johnson B.A., Herz J., Yu G. (2012). TDP-43 aggregation in neurodegeneration: are stress granules the key? *Brain Res.* 1462: 16-25.
- Dougherty S.E., Reeves J.L., Lesort M., Detloff P.J., Cowell R.M. (2012a). Purkinje cell dysfunction and loss in a knock-in mouse model of Huntington disease. *Exp Neurol.* 240: 96-102.

- Dougherty S.E., Reeves J.L., Lucas E.K., Gamble K.L., Lesort M., Cowell R.M. (2012b). Disruption of Purkinje cell function prior to huntingtin accumulation and cell loss in an animal model of Huntington disease. *Exp Neurol*. 236 (1): 171-178.
- Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 55 (3): 310-318.
- Doyon J., Penhune V., Ungerleider L.G. (2003). Distinct contribution of the cortico-striatal and cortico-cerebellar systems to motor skill learning. *Neuropsychologia*. 41 (3): 252-262.
- Duncan M.W., Kopin I.J., Garruto R.M., Lavine L., Markey S.P. (1988) 2-Amino-3 (methylamino)-propionic acid in cycad-derived foods is an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism. *Lancet*. 2 (8611): 631-632.
- Duncan M.W., Villacreses N.E., Pearson P.G., Wyatt L., Rapoport S.I., Kopin I.J., Markey S.P., Smith Q.R. (1991). 2-amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) pharmacokinetics and blood-brain barrier permeability in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 258 (1): 27-35.
- Dunlop R., Rodgers K. (2011): Proteins containing BMAA form autofluorescent aggregates and induce cell death. *Amyotroph.. Lateral Sclero*. 12 Suppl 1: 156.
- Dunlop R.A., Cox P.A., Banack S.A., Rodgers K.J. (2013). The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS One*. 8 (9): e75376.
- Dupuis L. (2013). Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. *Biochimie*. pii: S0300-9084 (13) 00278-2.
- Dupuis L., Gonzalez de Aguilar J.L., Oudart H., de Tapia M., Barbeito L., Loeffler J.P. (2004). Mitochondria in amyotrophic lateral sclerosis: A trigger and a target. *Neurodegener Dis* 1: 245–254.
- Embi N. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*. 107 (2): 519–527.

- Eom, T.Y., and Jope, R.S. (2009). GSK3 $\beta$  N-terminus binding to p53 promotes its acetylation. *Molecular Cancer*. 8: 14.
- Esterhuizen M., Downing T.G. (2008). Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol Environ Saf*. 71 (2): 309-313.
- Esterhuizen M., Pflugmacher S., Downing T.G. (2011).  $\beta$ -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 74 (1): 74-77.
- Esterhuizen-Londt M., Pflugmacher S., Downing T.G. (2011). The effect of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon*. 57 (5): 803-810.
- Farquhar M.G. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu Rev Cell Biol* 1: 447–488.
- Ferrante R.J., Browne S.E., Shinobu L.A., Bowling A.C., Baik M.J., MacGarvey U., Kowall N.W., Brown R.H. Jr., Beal M.F. (1997). Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 69 (5): 2064-2074.
- Ferrucci M., Fulceri F., Toti L., Soldani P., Siciliano G., Paparelli A., Fornai F. (2011). Protein clearing pathways in ALS. *Arch Ital Biol*. 149 (1): 121-149.
- Finney C.A., Hawkes C.A., Kain D.C., Dhabangi A., Musoke C., Cserti-Gazdewich C., Oravecz T., Liles W.C., Kain K.C. (2011). S1P is associated with protection in human and experimental cerebral malaria. *Mol Med*. 17 (7-8): 717-725.
- Flotow H., Graves P.R., Wang A.Q., Fiol C.J., Roeske R.W., Roach P.J. (1990). Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I action. *J Biol Chem* 265: 14264-14269.
- Foster C.A., Mechtcheriakova D., Storch M.K., Balatoni B., Howard L.M., Bornancin F., Wlachos A., Sobanov J., Kinnunen A., Baumruker T. (2009). FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune



- encephalomyelitis: expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage. *Brain Pathol.* 19 (2): 254-266.
- Fujita Y., Mizuno Y., Takatama M., Okamoto K. (2008). Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. *J Neurol Sci.* 269: 30-34.
- Fujita Y., Okamoto K. (2005). Golgi apparatus of the motor neurons in patients with amyotrophic lateral sclerosis and in mice models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology.* 25 (4): 388-394.
- Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S.R., Jangamreddy J.R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A.R., Kashani H.H., Hashemi M., Owji A.A., Los M.J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol.* 112: 24-49.
- Gandhi S., Abramov A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2012: 428010.
- Gao Z., van Beugen B.J., De Zeeuw C.I. (2012). Distributed synergistic plasticity and cerebellar learning. *Nat Rev Neurosci.* 13 (9): 619-635.
- Gatt S., Dagan A. (2012). Cancer and sphingolipid storage disease therapy using novel synthetic analogs of sphingolipids. *Chem Phys Lipids.* 165 (4): 462-474.
- Geser F., Brandmeir N.J., Kwong L.K., Martinez-Lage M., Elman L., McCluskey L., Xie S.X., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2008). Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 65 (5): 636-641.
- Glickman M., Malek R.L., Kwitek-Black A.E., Jacob H.J., Lee N.H. (1999). Molecular cloning, tissue-specific expression, and chromosomal localization of a novel nerve growth factor-regulated G-protein-coupled receptor, Nrg-1. *Mol Cell Neurosci.* 14 (2): 141-152.
- Gomez-Brouchet A., Pchejetski D., Brizuela L., Garcia V., Altié M.F., Maddelein M.L., Delisle M.B., Cuvillier O. (2007). Critical role for sphingosine kinase-1 in

- regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol.* 72 (2): 341-349.
- Gonatas N.K., Stieber A., Mourelatos Z., Chen Y., Gonatas J.O., Appel S.H., Hays A.P., Hickey W.F., Hauw J.J. (1992). Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol.* 140 (3): 731-737.
- Gong L., Zhang Q.L., Zhang N., Hua W.Y., Huang Y.X., Di P.W., Huang T., Xu X.S., Liu C.F., Hu L.F., Luo W.F. (2012). Neuroprotection by urate on 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease: linking to Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway. *J Neurochem.* 123 (5): 876-885.
- Gorbatyuk M.S., Gorbatyuk O.S. (2013). The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. *J Genet Syndr Gene Ther.* 4 (2). pii: 128.
- Goto J.J., Koenig J.H., Ikeda K. (2012). The physiological effect of ingested  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 156 (3-4): 171-177.
- Gräler M.H., Bernhardt G., Lipp M. (1998). EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue. *Genomics* 53 (2): 164-169.
- Gross S.D., Anderson R.A. (1998). Casein kinase I: Spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell Signal.* 10: 699–711.
- Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S. (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1758, 2016–2026.
- Halestrap A.P., Pasdois P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta.* 1787 (11): 1402-1415.
- Hancke K., Strauch O., Kissel C., Göbel H., Schäfer W., Denschlag D. (2007). Sphingosine 1-phosphate protects ovaries from chemotherapy-induced damage in vivo. *Fertil Steril.* 87 (1): 172-177.

- Hannun, Y.A., Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.
- Hasegawa Y., Suzuki H., Sozen T., Rolland W., Zhang J.H. (2010). Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke.* 41 (2): 368-374.
- Hensley K., Mhatre M., Mou S., Pye Q.N., Stewart C., West M, Williamson K.S. (2006). On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: Lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal* 8: 2075–2087.
- Hervias I., Beal M.F., and Manfredi G. (2006). Mitochondrial dysfunction and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 33: 598–608.
- Higgins C.M., Jung C., Xu Z. (2003). ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* 4: 16.
- Hirano A., Donnenfeld H., Sasaki S., Nakano I. (1984a). Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43 (5): 461-470.
- Hirano A., Nakano I., Kurland L.T., Mulder D.W., Holley P.W., Saccomanno G. (1984b). Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 43 (5): 471-480.
- Holtkamp W. (2012). The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ Health Perspect.* 120 (3): A110-A116.
- Hur E.M., Zhou F.Q. (2010). GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci.* 11 (8): 539-551.
- Igaz L.M., Kwong L.K., Lee E.B., Chen-Plotkin A., Swanson E., Unger T., Malunda J., Xu Y., Winton M.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2011). Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J Clin Invest.* 121 (2): 726-738.

- Iijima T. (2006). Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res.* 55 (3): 234-243.
- Ilieva E.V., Ayala V., Jové M., Dalfó E., Cacabelos D., Povedano M., Bellmunt M.J., Ferrer I., Pamplona R., Portero-Otín M. (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain.* 130 (Pt 12): 3111-3123.
- Ilzecka J. (2003). Total antioxidant status is increased in the serum of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Scand J Clin Lab Invest.* 63 (4): 297-302.
- Ishii I., Friedman B., Ye X., Kawamura S., McGiffert C., Contos J.J.A., Kingsbury M.A., Zhang G., Brown J.H., Chun J. (2001). Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LPB3/EDG-3. *J Biol Chem.* 276 (36): 33697-33704.
- Ito M. (1984). *The cerebellum and neural control.* New York: Raven Press.
- Ito M. (1987). Signal processing in cerebellar Purkinje cells. *Physiol Bohemoslov.* 36 (3): 203-216.
- Ito M. (1990). A new physiological concept on cerebellum. *Rev Neurol (Paris).* 146 (10): 564-569.
- Johnson B.S., McCaffery J.M., Lindquist S., Gitler A.D. (2008). A yeast TDP-43 proteinopathy model: Exploring the molecular determinants of TDP-43 aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105 (17): 6439-6444
- Jonasson S., Eriksson J., Berntzon L., Spácil Z., Ilag L.L., Ronnevi L.O., Rasmussen U., Bergman B. (2010). Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (20): 9252-9257.
- Jopec R.S., Johnson G.V. (2004). The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 29 (2): 95-102.

- Josephs K.A., Murray M.E., Whitwell J.L., Parisi J.E., Petrucelli L., Jack C.R., Petersen R.C., Dickson D.W. (2013). Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2013 Nov 16. [Epub ahead of print].
- Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A., Kirisako T., Noda T., Kominami E., Ohsumi Y., Yoshimori T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19 (21): 5720-5728.
- Kametani F., Nonaka T., Suzuki T., Arai T., Dohmae N., Akiyama H., Hasegawa M. (2009). Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. *Biochem Biophys Res Commun.* 382: 405–409.
- Karamyan V.T., Speth R.C. (2008). Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82 (5-6): 233-246.
- Karlsson O., Lindquist N.G., Brittebo E.B., Roman E. (2009). Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol Sci.* 109 (2): 286-295.
- King A., Maekawa S., Bodi I., Troakes C., Al-Sarraj S. (2011). Ubiquitinated, p62 immunopositive cerebellar cortical neuronal inclusions are evident across the spectrum of TDP-43 proteinopathies but are only rarely additionally immunopositive for phosphorylation-dependent TDP-43. *Neuropathology.* 31 (3): 239-249.
- King M.K., Pardo M., Cheng Y., Downey K., Jope R.S., Beurel E. (2013). Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol Ther.* pii: S0163-7258 (13) 00156-3.
- Knippschild U., Gocht A., Wolff S., Huber N., Lohler J., Stoter M. (2005). The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17: 675–689.
- Kremer A., Louis J.V., Jaworski T., Van Leuven F. (2011). GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction.... *Front Mol Neurosci.* 4: 17.

- Kurland L.T. (1988). Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci.* 11 (2): 51-54.
- Kurtzke J.F. (1982). Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 36: 281-302.
- Lagadari M., Lehmann K., Ziemer M., Truta-Feles K., Berod L., Idzko M., Barz D., Kamradt T., Maghazachi A.A., Norgauer J. (2009). Sphingosine-1-phosphate inhibits the cytotoxic activity of NK cells via Gs protein-mediated signalling. *Int J Oncol.* 34 (1): 287-294.
- Lalonde, R., and Strazielle, C. (2007). Brain regions and genes affecting postural control. *Prog Neurobiol.* 81: 45–60.
- Lee E.B., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2011). Gains or losses: molecular mechanisms of TDP43-mediated neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 13 (1): 38-50.
- Lee J.H., Jang S., Jeong H.S., Park J.S. (2011). Effects of sphingosine-1-phosphate on neural differentiation and neurite outgrowth in neuroblastoma cells. *Chonnam Med J.* 47 (1): 27-30.
- Lee M., McGeer P.L. (2012). Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement  $\beta$ -alanine. *Neurobiol Aging.* 33 (7): 1440-1447.
- Leroy K., Brion J.P. (1999). Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in rat brain. *J Chem Neuroanat.* 16 (4): 279-293.
- Leverenz J.B., Yu C.E., Montine T.J., Steinbart E., Bekris L.M., Zabetian C., Kwong L.K., Lee V.M., Schellenberg G.D., Bird T.D. (2007). A novel progranulin mutation associated with variable clinical presentation and tau, TDP43 and alpha-synuclein pathology. *Brain.* 130 (Pt 5): 1360-1374.
- Lezi E., Swerdlow R.H. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Adv Exp Med Biol.* 942: 269-286.
- Lin W.L., Dickson D.W. (2008). Ultrastructural localization of TDP-43 in filamentous neuronal inclusions in various neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 116 (2): 205-213.

- Liscic R.M., Grinberg L.T., Zidar J., Gitcho M.A., Cairns N.J. (2008). ALS and FTLT: two faces of TDP-43 proteinopathy. *Eur J Neurol.* 15 (8): 772-780.
- Liu C.M., Hur E.M., Zhou F.Q. (2012). Coordinating Gene Expression and Axon Assembly to Control Axon Growth: Potential Role of GSK3 Signaling. *Front Mol Neurosci.* 5: 3.
- Liu X., Rush T., Zapata J., Lobner D. (2009). beta-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(-). *Exp Neurol.* 217(2): 429-433.
- Liu-Yesucevitz L., Bilgutay A., Zhang Y.J., Vanderweyde T., Citro A., Mehta T., Zaarur N., McKee A., Bowser R., Sherman M., Petrucelli L., Wolozin B. (2010). Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One.* 5 (10): e13250.
- Lobner D. (2009). Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotroph Lateral Scler.* 10 Suppl 2: 56-60.
- Lobner D., Piana P.M., Salous A.K., Peoples R.W. (2007). Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis.* 25 (2): 360-366.
- Lonchamp E., Dupont J.L., Beekenkamp H., Poulain B., Bossu J.L. (2006). The mouse cerebellar cortex in organotypic slice cultures: an in vitro model to analyze the consequences of mutations and pathologies on neuronal survival, development, and function. *Crit Rev Neurobiol.* 18 (1-2): 179-186.
- Lum J.J., Bauer D.E., Kong M., Harris M.H., Li C., Lindsten T., Thompson C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell.* 120 (2): 237-248.
- Mackenzie I.R., Rademakers R., Neumann M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol.* 9 (10): 995-1007.
- Manfredi G., Xu Z. (2005). Mitochondrial dysfunction and its role in motor neuron degeneration in ALS. *Mitochondrion.* 5 (2): 77-87.

- Martin L.J. (2010). The mitochondrial permeability transition pore: a molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1802 (1): 186-197.
- Martin L.J. (2012). Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 107: 355-415.
- Martinez A., Gil C., Perez D.I. (2011). Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. *Int J Alzheimers Dis*. 2011: 280502.
- Matsuoka Y., Rakonczay Z., Giacobini E., Naritoku D. (1993). L-beta-methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 44 (3): 727-734.
- Mavroudis I.A., Manani M.G., Petrides F., Petsoglou K., Njau S.D., Costa V.G., Baloyannis S.J. (2013). Dendritic and spinal pathology of the Purkinje cells from the human cerebellar vermis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub*. 25 (3): 221-226.
- Meares G.P., Jope R.S. (2007). Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem*. 282 (23): 16989-17001.
- Medina M., Avila J. (2010). Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 16 (25): 2790-2798.
- Meisler M.H., Russ C., Montgomery K.T., Greenway M., Ennis S., Hardiman O., Figlewicz D.A., Quenneville N.R., Conibear E., Brown R.H. Jr. (2008). Evaluation of the Golgi trafficking protein VPS54 (wobbler) as a candidate for ALS. *Amyotroph Lateral Scler*. 9 (3): 141-148.
- Meng H., Yuan Y., Lee V.M. (2011). Loss of sphingosine kinase 1/S1P signaling impairs cell growth and survival of neurons and progenitor cells in the developing sensory ganglia. *PLoS One*. 6 (11): e27150.
- Menzies F.M., Cookson M.R., Taylor R.W., Turnbull D.M., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Dong L., Figlewicz D.A., Shaw P.J. (2002a). Mitochondrial dysfunction in



- a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*. 125 (Pt 7): 1522-1533.
- Menzies F.M., Ince P.G., Shaw P.J. (2002b). Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Int*. 40 (6): 543-551.
- Metcalf J.S., Banack S.A., Lindsay J., Morrison L.F., Cox P.A., Codd G.A. (2008). Co-occurrence of b-Nmethyramino- L-alanine, a neurotoxic amino acid, with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ Microbiol*. 10: 702–708.
- Miana-Mena F.J., González-Mingot C., Larrodé P., Muñoz M.J., Oliván S., Fuentes-Broto L., Martínez-Ballarín E., Reiter R.J., Osta R., García J.J. (2011). Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 258 (5): 762-769.
- Miguel B.G., Calcerrada M.C., Catalán R.E., Martínez A.M. (2001). Sphingolipid derivatives modulate intracellular Ca<sup>2+</sup> in rat synaptosomes. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 61 (2): 113-117.
- Miguel B.G., Fernández I., Toboso I., Agudo-López A., Catalán E., Martínez A.M. (2008). Sphingosylphosphorylcholine induces mitochondria-mediated apoptosis in neuro 2a cells: involvement of protein kinase C. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 68 (4): 443-452.
- Miki Y., Mori F., Nunomura J., Ookawa K., Yajima N., Yagihashi S., Wakabayashi K. (2010). Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with pallido-nigro-luysian degeneration: a TDP-43 immunohistochemical study. *Neuropathology*. 30 (2): 149-153.
- Mora A., Sabio G., González-Polo R.A., Cuenda A., Alessi D.R., Alonso J.C., Fuentes J.M., Soler G., Centeno F. (2001). Lithium inhibits caspase 3 activation and dephosphorylation of PKB and GSK3 induced by K<sup>+</sup> deprivation in cerebellar granule cells. *J Neurochem*. 78 (1): 199-206.
- Morita Y., Perez G.I., Paris F., Miranda S.R., Ehleiter D., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., Xie Z., Reed J.C., Schuchman E.H., Kolesnick R.N., Tilly J.L. (2000). Oocyte

- apoptosis is suppressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. *Nat Med.* 6 (10): 1109-1114.
- Morris H.R., Lees A.J., Wood N.W. (1999). Neurofibrillary tangle parkinsonian disorders--tau pathology and tau genetics. *Mov Disord.* 14 (5): 731-736.
- Moujalled D., James J.L., Parker S.J., Lidgerwood G.E., Duncan C., Meyerowitz J., Nonaka T., Hasegawa M., Kanninen K.M., Grubman A., Liddell J.R., Crouch P.J., White A.R. (2013). Kinase Inhibitor Screening Identifies Cyclin-Dependent Kinases and Glycogen Synthase Kinase 3 as Potential Modulators of TDP-43 Cytosolic Accumulation during Cell Stress. *PLoS One.* 8 (6): e67433.
- Mourelatos Z., Adler H., Hirano A., Donnenfeld H., Gonatas J.O., Gonatas N.K. (1990). Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis revealed by organelle-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (11): 4393-4395.
- Mukherjee S., Chiu R., Leung S.M., and Shields D. (2007). Fragmentation of the Golgi apparatus: an early apoptotic event independent of the cytoskeleton. *Traffic* 8: 369–378.
- Muñoz-Saez E., de Munck E., Arahuetes R.M., Solas M.T., Martínez A.M., Miguel B.G. (2013).  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma. *J Toxicol Sci.* 38 (3): 425-430.
- Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A. (2004a). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (33): 12228-12231.
- Murch S.J., Cox P.A., Banack S.A., Steele J.C., Sacks O.W. (2004b). Occurrence of  $\beta$ -methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 110 (4): 267–269.
- Nagley P., Higgins G.C., Atkin J.D., Beart P.M. (2010). Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim Biophys Acta.* 1802 (1): 167-185.

- Nakagomi S., Barsoum M.J., Bossy-Wetzel E., Sütterlin C., Malhotra V., Lipton S.A. (2008). A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 29 (2): 221-231.
- Nakahara T., Iwase A., Nakamura T., Kondo M., Bayasula, Kobayashi H., Takikawa S., Manabe S., Goto M., Kotani T., Kikkawa F. (2012). Sphingosine-1-phosphate inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. *Fertil Steril.* 98 (4): 1001-1008.
- Nassif M., Hetz C. (2011). Targeting autophagy in ALS: a complex mission. *Autophagy.* 7 (4): 450-453.
- Nassif M., Matus S., Castillo K., Hetz C. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. *Antioxid Redox Signal.* 13 (12): 1955-1989.
- Neumann M., Igaz L.M., Kwong L.K., Nakashima-Yasuda H., Kolb S.J., Dreyfuss G., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2007). Absence of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and survival motor neuron protein in TDP-43 positive inclusions in frontotemporal lobar degeneration. *Acta Neuropathol.* 113 (5): 543-548.
- Neumann M., Kwong L.K., Lee E.B., Kremmer E., Flatley A., Xu Y., Forman M.S., Troost D., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2009). Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a consistent feature in all sporadic and familial forms of TDP-43 proteinopathies. *Acta Neuropathol.* 117 (2): 137-149.
- Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretzschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 314 (5796): 130-133.
- Nicholls D.G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 34 (11): 1372-1381.

- Nishimoto Y., Ito D., Yagi T., Nihei Y., Tsunoda Y., Suzuki N. (2010). Characterization of alternative isoforms and inclusion body of the TAR DNA-binding protein-43. *J Biol Chem.* 285 (1): 608-619.
- Nishitoh H., Kadowaki H., Nagai A., Maruyama T., Yokota T., Fukutomi H., Noguchi T., Matsuzawa A., Takeda K., Ichijo H. (2008). ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev.* 22: 1451–1464.
- Nonaka T., Kametani F., Arai T., Akiyama H., Hasegawa M. (2009). Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet.* 18 (18): 3353-3364.
- Nunn P.B. (2009). Three phases of research on beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA)--a neurotoxic amino acid. *Amyotroph Lateral Scler.* 10 Suppl 2: 26-33.
- Nunn P.B., Ponnusamy M. (2009). Beta-N-methylaminoalanine (BMAA): metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. *Toxicol.* 54 (2): 85-94.
- Okle O., Stemmer K., Deschl U., Dietrich D.R. (2013). L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicol Sci.* 131 (1): 217-224.
- Oyanagi K., Yamazaki M., Takahashi H., Watabe K., Wada M., Komori T., Morita T., Mizutani T. (2008). Spinal anterior horn cells in sporadic amyotrophic lateral sclerosis show ribosomal detachment from, and cisternal distention of the rough endoplasmic reticulum. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34 (6): 650-658.
- Pablo J., Banack S.A., Cox P.A., Johnson T.E., Papapetropoulos S., Bradley W.G., Buck A., Mash D.C. (2009). Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 120 (4): 216-225.
- Palomo V., Perez D.I., Gil C., Martinez A. (2011). The potential role of glycogen synthase kinase 3 inhibitors as amyotrophic lateral sclerosis pharmacological therapy. *Curr Med Chem.* 18 (20): 3028-3034.

- Panov A., Dikalov S., Shalbuyeva N., Hemendinger R., Greenamyre J.T., Rosenfeld J. (2007). Species- and tissue-specific relationships between mitochondrial permeability transition and generation of ROS in brain and liver mitochondria of rats and mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292 (2): C708-C718.
- Papapetropoulos S. (2007). Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem Int.* 50 (7-8): 998-1003.
- Perez D.I., Gil C., Martinez A. (2011). Protein kinases CK1 and CK2 as new targets for neurodegenerative diseases. *Med Res Rev.* 31 (6): 924-954.
- Perry T.L., Bergeron C., Biro A.J., Hansen S. (1989). Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J Neurol Sci.* 94 (1-3): 173-180.
- Pesiridis G.S., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2009). Mutations in TDP-43 link glycine-rich domain functions to amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet.* 18 (R2): R156-R162.
- Pesiridis G.S., Tripathy K., Tanik S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2011). A "two-hit" hypothesis for inclusion formation by carboxyl-terminal fragments of TDP-43 protein linked to RNA depletion and impaired microtubule-dependent transport. *J Biol Chem.* 286 (21): 18845-18855.
- Podbielska M., Krotkiewski H., Hogan E.L. (2012). Signaling and regulatory functions of bioactive sphingolipids as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 37 (6): 1154-1169.
- Polsky F.I., Nunn P.B., Bell E.A. (1972). Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Fed Proc.* 31 (5): 1473-1475.
- Poorkaj P., Tsuang D., Wijsman E., Steinbart E., Garruto R.M., Craig U.K., Chapman N.H., Anderson L., Bird T.D., Plato C.C., Perl D.P., Weiderholt W., Galasko D., Schellenberg G.D. (2001). TAU as a susceptibility gene for amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia complex of Guam. *Arch Neurol.* 58 (11): 1871-1878.

- Putney J.W. Jr., Thomas A.P. (2006). Calcium signaling: double duty for calcium at the mitochondrial uniporter. *Curr Biol.* 16 (18): R812-R815.
- Pyne S., Pyne N.J. (2000). Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem J.* 349 (Pt 2): 385-402.
- Pyne S., Pyne N.J. (2011). Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology. *Trends Mol Med.* 17 (8): 463-472.
- Raimondi A., Mangolini A., Rizzardini M., Tartari S., Massari S., Bendotti C., Francolini M., Borgese N., Cantoni L., Pietrini G. (2006). Cell culture models to investigate the selective vulnerability of motoneuronal mitochondria to familial ALS-linked G93ASOD1. *Eur J Neurosci.* 24 (2): 387-399.
- Rakonczay Z., Matsuoka Y., Giacobini E. (1991). Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J Neurosci Res.* 29 (1): 121-126.
- Reddy P.H. (2008). Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med.* 10 (4): 291-315.
- Rizzuto R., Pozzan T. (2006). Microdomains of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ : molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev.* 86 (1): 369-408.
- Robberecht W. (2000). Oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol.* 247 Suppl 1: I1-6.
- Robberecht W., Philips T. (2013). The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 14 (4): 248-264.
- Rodgers K., Dunlop R. (2011): The cyanobacteria-derived BMAA can be incorporated into cell proteins and could thus be an environmental trigger for ALS and other neurological diseases associated with protein misfolding. *Amyotroph. Lateral Sclero.* 12 Suppl 1: 22.
- Ron D., Walter P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8 (7): 519-529.

- Ross S.M., Seelig M., Spencer P.S. (1987). Specific antagonism of excitotoxic action of 'uncommon' amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res.* 425 (1): 120-127.
- Rowland L.P., Shneider N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med.* 344 (22): 1688-1700.
- Rüb U., Schöls L., Paulson H., Auburger G., Kermer P., Jen J.C., Seidel K., Korf H.W., Deller T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol.* 104: 38-66.
- Rubio I., Rodríguez-Navarro J.A., Tomás-Zapico C., Ruiz C., Casarejos M.J., Perucho J., Gomez A., Rodal I., Lucas J.J., Mena M.A., de Yébenes J.G. (2009). Effects of partial suppression of parkin on huntingtin mutant R6=1 mice. *Brain Res* 1281: 91-100.
- Rutkowski D.T., Kaufman R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14 (1): 20-28.
- Sakamaki J., Daitoku H., Kaneko Y., Hagiwara A., Ueno K., Fukamizu A. (2012). GSK3 $\beta$  regulates gluconeogenic gene expression through HNF4 $\alpha$  and FOXO1. *J Recept Signal Transduct Res.* 32 (2): 96-101.
- Sakurai A., Goto Y. (1987). Chemical studies on the lichen. I: The structure of isolecanoric acid, a new ortho-depside isolated from *parmelia tinctorum*. Despr, Tokyo, Japon, Chemical Society of Japan.
- Salcedo-Tello P., Ortiz-Matamoros A., Arias C. (2011). GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis.* 2011: 189728.
- Sampathu D.M., Neumann M., Kwong L.K., Chou T.T., Micsenyi M., Truax A., Bruce J., Grossman M., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2006). Pathological heterogeneity of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions delineated by ubiquitin immunohistochemistry and novel monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* 169 (4):1343-1352.

- Santiago M., Matarredona E.R., Machado A., Cano J. (2006). Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis. *Toxicol Lett.* 167 (1): 34-39.
- Sasaki S., Iwata M. (1996). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 204 (1-2): 53-56.
- Sasaki S., Iwata M. (1999). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 268 (1): 29-32.
- Sasaki S., Takeda T., Shibata N., Kobayashi M. (2010). Alterations in subcellular localization of TDP-43 immunoreactivity in the anterior horns in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett.* 478 (2): 72-76.
- Schröder M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.* 65 (6): 862-894.
- Schwab C., Arai T., Hasegawa M., Yu S., McGeer P.L. (2008). Colocalization of transactivation-responsive DNA-binding protein 43 and huntingtin in inclusions of Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 67 (12): 1159-1165.
- Seawright A.A., Brown A.W., Nolan C.C., Cavanagh J.B. (1990). Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 16 (2): 153-169.
- Shaw P.J., Ince P.G., Falkous G., Mantle D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol.* 38 (4): 691-695.
- Shi P., Gal J., Kwinter D.M., Liu X., Zhu H. (2010a). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1802 (1): 45-51.
- Shi P., Wei Y., Zhang J., Gal J., Zhu H. (2010b). Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis.* 20 Suppl 2: S311-324.



- Siklós L., Engelhardt J., Harati Y., Smith R.G., Joó F., Appel S.H. (1996). Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 39 (2): 203-216.
- Sivonen K., Jones G. (1993). Cyanobacterial toxins. In: Chorus,I., Bartram,J.(Eds.), *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&F.N. Spon, London, pp. 41–111.
- Slodzinski H., Moran L.B., Michael G.J., Wang B., Novoselov S., Cheetham M.E., Pearce R.K., Graeber M.B. (2009). Homocysteine- induced endoplasmic reticulum protein (herp) is up-regulated in parkinsoniansubstantianigra and present in the core of Lewy bodies. *Clin Neuropathol* 28: 333–343.
- Smith Q.R. (2000). Transport of Glutamate and Other Amino Acids at the Blood-Brain Barrier. *J. Nutr.* 130: 1016S–1022S.
- Son J.H., Shim J.H., Kim K.H., Ha J.Y., Han J.Y. (2012). Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med.* 44 (2): 89-98.
- Sotelo-Silveira J.R., Lepanto P., Elizondo V., Horjales S., Palacios F., Martinez-Palma L., Marin M., Beckman J.S., Barbeito L. (2009). Axonal mitochondrial clusters containing mutant SOD1 in transgenic models of ALS. *Antioxid Redox Signal.* 11 (7): 1535-1545.
- Spencer P.S., Hugon J., Ludolph A., Nunn P.B., Ross S.M., Roy D.N., Schaumburg H.H. (1987a). Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins. *Ciba Found Symp.* 126: 221-238.
- Spencer P.S., Kisby G.E., LudolphA.C. (1991). Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region.*Neurology.* 41 (5 Suppl 2): 62-66; discussion 66-68.
- Spencer P.S., Nunn P.B., Hugon J., Ludolph A.C., Ross S.M., Roy D.N., Robertson R.C. (1987b). Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science.* 237 (4814): 517-522.
- Stallings N.R., Puttaparthi K., Luther C.M., Burns D.K., Elliott J.L. (2010). Progressive motor weakness in transgenic mice expressing human TDP-43. *Neurobiol Dis.* 40 (2): 404-414.

- Staton P.C., Bristow D.R. (1997). The dietary excitotoxins beta-N-methylamino-L-alanine and beta-N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 69 (4): 1508-1518.
- Staton P.C., Bristow D.R. (1998). Role of group III metabotropic glutamate receptors in excitotoxin-induced cerebellar granule cell death. *J Neurochem.* 71 (3): 1280-1288.
- Stieber A., Chen Y., Wei S., Mourelatos Z., Gonatas J., Okamoto K., Gonatas N.K. (1998). The fragmented neuronal Golgi apparatus in amyotrophic lateral sclerosis includes the trans-Golgi-network: functional implications. *Acta Neuropathol.* 95 (3): 245-253.
- Stieber A., Gonatas J.O., Collard J., Meier J., Julien J., Schweitzer P., Gonatas N.K. (2000). The neuronal Golgi apparatus is fragmented in transgenic mice expressing a mutant human SOD1, but not in mice expressing the human NF-H gene. *J Neurol Sci.* 173 (1): 63-72.
- Stipa G., Taiuti R., de Scisciolo G., Arnetoli G., Tredici M.R., Biondi N., Barsanti L., Lolli F. (2006). Sporadic amyotrophic lateral sclerosis as an infectious disease: a possible role of cyanobacteria? *Med Hypotheses.* 67 (6): 1363-1371.
- Sutherland C., Leighton I.A., Cohen P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 296 (Pt 1): 15-19.
- Swarup V., Phaneuf D., Dupré N., Petri S., Strong M., Kriz J., Julien J.P. (2011). Deregulation of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis triggers nuclear factor  $\kappa$ B-mediated pathogenic pathways. *J Exp Med.* 208 (12): 2429-2447.
- Szegezdi E., Macdonald D.C., Ní Chonghaile T., Gupta S., Samali A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296 (5): C941-C953.
- Takuwa Y., Du W., Qi X., Okamoto Y., Takuwa N., Yoshioka K. (2010). Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World J Biol Chem.* 1 (10): 298-306.

- Tavarini S., Colombaioni L., Garcia-Gil M. (2000). Sphingomyelinase metabolites control survival and apoptotic death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 285 (3): 185-188.
- Thach W.T. (1998). A role for the cerebellum in learning movement coordination. *Neurobiol Learn Mem.* 70 (1-2): 177-188.
- Thieme A., Thürling M., Galuba J., Burciu R.G., Göricke S., Beck A., Aurich V., Wondzinski E., Siebler M., Gerwig M., Bracha V., Timmann D. (2013). Storage of a naturally acquired conditioned response is impaired in patients with cerebellar degeneration. *Brain.* 136 (Pt 7): 2063-2076.
- Tsai K.J., Yang C.H., Fang Y.H., Cho K.H., Chien W.L., Wang W.T., Wu T.W., Lin C.P., Fu W.M., Shen C.K. (2010). Elevated expression of TDP-43 in the forebrain of mice is sufficient to cause neurological and pathological phenotypes mimicking FTL-D. *J Exp Med.* 207 (8): 1661-1673.
- Tsuiji H., Nonaka T., Yamashita M., Masuda-Suzukake M., Kametani F., Akiyama H., Mann D.M., Tamaoka A., Hasegawa M. (2012). Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 417 (1): 116-121.
- Turner B.J., Atkin J.D. (2006). ER stress and UPR in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Mol Med.* 6 (1): 79-86.
- Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H.P., Ron D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 287 (5453): 664-666.
- Valvezan A.J., Klein P.S. (2012). GSK-3 and Wnt Signaling in Neurogenesis and Bipolar Disorder. *Front Mol Neurosci.* 5: 1.
- Van Brocklyn J.R., Williams J.B. (2012). The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 163 (1): 26-36.

- Van Eersel J., Ke Y.D., Gladbach A., Bi M., Götz J., Kril J.J., Ittner L.M. (2011). Cytoplasmic accumulation and aggregation of TDP-43 upon proteasome inhibition in cultured neurons. *PLoS One*. 6 (7): e22850.
- Van Wauwe J., Haefner B. (2003). Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention. *Drug News Perspect*. 16 (9): 557-565.
- Vance J.M., Ali S., Bradley W.G., Singer C., Di Monte D.A. (2010). Gene-environment interactions in Parkinson's disease and other forms of parkinsonism. *Neurotoxicology*. 31 (5): 598-602.
- Vega, A., Bell, E.A. (1967).  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methyl-aminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycascircinalis*. *Phytochemistry* 6: 759–762.
- Vega, A., Bell, E.A., Nunn, P.B. (1968). The preparation of L- and D- $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acids and the identification of the compound isolated from *Cycascircinalis* as the L-isomer. *Phytochemistry* 7: 1885–1887.
- Vembar S.S., Brodsky J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9 (12): 944-957.
- Vogel M.W., Caston J., Yuzaki M., Mariani J. (2007). The Lurcher mouse: fresh insights from an old mutant. *Brain Res*. 1140: 4-18.
- Vuk S., James R. W. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J*. 303, 701-704.
- Wagman A.S., Johnson K.W., Bussiere D.E. (2004). Discovery and development of GSK3 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Pharm Des*. 10 (10): 1105-1137.
- Walker A.K., Atkin J.D. (2011). Stress signaling from the endoplasmic reticulum: A central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB Life*. 63 (9): 754-763.
- Wang I.F., Guo B.S., Liu Y.C., Wu C.C., Yang C.H., Tsai K.J., Shen C.K. (2012). Autophagy activators rescue and alleviate pathogenesis of a mouse model with

- proteinopathies of the TAR DNA-binding protein 43. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (37): 15024-15029.
- Wang J.Y., Wen L.L., Huang Y.N., Chen Y.T., Ku M.C. (2006). Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des*. 12 (27): 3521-3533.
- Wang Q.J., Ding Y., Kohtz D.S., Mizushima N., Cristea I.M., Rout M.P., Chait B.T., Zhong Y., Heintz N., Yue Z. (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci*. 26 (31): 8057-8068.
- Wang X., Fan H., Ying Z., Li B., Wang H., Wang G. (2010). Degradation of TDP-43 and its pathogenic form by autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Neurosci Lett*. 469 (1): 112-116.
- Wang, H.Y., Wang I.F., Bose J., Shen C.K.J. (2004). Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*. 83: 130–139.
- Weiss J.H., Choi D.W. (1988). Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science*. 241 (4868): 973-975.
- Whiting, M.G. (1988). Toxicity of cycads: implications for neurodegenerative diseases and cancer. *Transcripts of Four Cycad Conferences. The First Cycad Conference: 1962. Third World Medical Research Foundation, New York*, pp. 1–17.
- Wijesekera L.C., Leigh P.N. (2009). Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet J Rare Dis*. 4: 3.
- Winton M.J., Igaz L.M., Wong M.M., Kwong L.K., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2008). Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem*. 283 (19): 13302-13309.
- Wong P.C., Pardo C.A., Borchelt D.R., Lee M.K., Copeland N.G., Jenkins N.A., Sisodia S.S., Cleveland D.W., Price D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*. 14 (6): 1105-1116.

- Woodgett J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3: Factor A. *EMBO J.* 9: 2431–2438.
- Woodgett J.R., Cohen P. (1984). Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta.* 788: 339–347.
- Wu J.Y., Prentice H. (2010). Role of taurine in the central nervous system. *J Biomed Sci.* 17 Suppl 1: S1.
- Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 123 (8): 1086-1092.
- Xu C., Kim N.G., Gumbiner B.M. (2009). Regulation of protein stability by GSK3 mediated phosphorylation. *Cell Cycle.* 8 (24): 4032-4039.
- Xu Y.F., Gendron T.F., Zhang Y.J., Lin W.L., D'Alton S., Sheng H., Casey M.C., Tong J., Knight J., Yu X., Rademakers R., Boylan K., Hutton M., McGowan E., Dickson D.W., Lewis J., Petrucelli L. (2010). Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice. *J Neurosci.* 30 (32): 10851-10859.
- Yamamoto A., Simonsen A. (2011). The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 43 (1): 17-28.
- Yang H., Zhou X.J., Zhang M.M., Zheng X.N., Zhao Y.L., Wang J. (2013). Changes in spontaneous brain activity in early Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 549: 24-28.
- Yang J.L., Weissman L., Bohr V.A., Mattson M.P. (2008). Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders. *DNA Repair (Amst).* 7 (7): 1110-1120.
- Yang W., Leystra-Lantz C., Strong M.J. (2008). Upregulation of GSK3 beta expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res.* 1196: 131-139.

- Yue Z., Horton A., Bravin M., DeJager P.L., Selimi F., Heintz N. (2002). A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*. 35 (5): 921-933.
- Zhang X., Li L., Chen S., Yang D., Wang Y., Zhang X., Wang Z., Le W. (2011). Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. 7 (4): 412-425.
- Zhang Y.J., Xu Y.F., Cook C., Gendron T.F., Roettges P., Link C.D., Lin W.L., Tong J., Castanedes-Casey M., Ash P., Gass J., Rangachari V., Buratti E., Baralle F., Golde T.E., Dickson D.W., Petrucelli L. (2009). Aberrant cleavage of TDP-43 enhances aggregation and cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (18): 7607-7612.
- Zhang Y.J., Xu Y.F., Dickey C.A., Buratti E., Baralle F., Bailey R., Pickering-Brown S., Dickson D., Petrucelli L. (2007). Progranulin mediates caspase-dependent cleavage of TAR DNA binding protein-43. *J Neurosci*. 27 (39): 10530-10534.

## **9. RESULTADOS PUBLICADOS**





COMUNICACIÓN ORAL EN EL CONGRESO INTERNACIONAL “FRONTIERS IN MEDICINAL CHEMISTRY” CELEBRADO EN JUNIO DE 2011, EN ESTOCOLMO, SUECIA.

**“Increased motor neuron survival and cellular viability employing protein kinase inhibitors for Amiotrophic Lateral Sclerosis”**

*Daniel I. Pérez,<sup>1</sup> Ernesto Miquel,<sup>2</sup> Begoña G. Miguel,<sup>3</sup> Valle Palomo,<sup>1</sup> Estefanía de Munck,<sup>4</sup> Emma Muñoz,<sup>4</sup> Concepción Pérez,<sup>1</sup> Carmen Gil,<sup>1</sup> Laura Martinez-Palma,<sup>2</sup> Rosa M. Arahuetes,<sup>4</sup> Ana Pérez-Castillo,<sup>5</sup> Patricia Cassina,<sup>2</sup> Ana Martínez<sup>1</sup>.*

*1-Instituto de Química Médica-CSIC, Madrid, Spain.*

*2-Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.*

*3-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.*

*4-Departamento de Fisiología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Spain.*

*5-Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Madrid, Spain.*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal disorder of motor neuron degeneration from the cortex, brainstem and spinal cord resulting in muscle weakness and atrophy. The progressive degeneration of the motor neurons in ALS eventually leads to their death. Most hypotheses for this selective cell loss have primarily addressed early changes in motor neurons involving oxidative damage, defective cytoskeletal function, protein misfolding and aggregation and excitotoxicity from disruption of extracellular glutamate homeostasis [1].

ALS etiology is unclear. Approximately 10% of ALS cases, termed familial ALS (fALS), have a clear genetic link, while 90% of Sporadic ALS (sALS) represents 90-95% of all ALS cases [2]. For sporadic ALS there is a toxic hypothesis where the -N-methylamino-L-alanine (BMAA) was proposed to contribute to the ALS/Parkinsonism-dementia complex of Guam (ALS/PDC) based on its presence in cycad seeds and because of the exposure from desert dust among Gulf war veterans.

L-BMAA induces progressive motoneuronal damage and symptoms that closely resemble ALS in the cynomolgus monkey and excitotoxic changes in rat and mouse cultured cortical neurons [3].

Due to the fact that there is no effective treatment for ALS the search for new drugs able to modify the course of neurodegeneration of the disease is of utmost importance. Our group has expertise in the design and synthesis of innovative drugs, mainly protein kinase inhibitors for the treatment of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease [4, 5]. Here we present the results of two of our kinase inhibitors VP-2.51 and DIP-5.5 in cellular cultures exposed to the BMAA toxin, finding an increased cellular viability and motor neuron survival under trophic factor deprivation, together with a protection against inflammatory damage produced by nitrites in astrocytes and microglia. Based on these results we can consider the potential of these two compounds as a possible treatment for ALS.

#### References

- [1] Barbeito, L. H.; Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas M.R.; Peluffo, H.; Viera, L.; Estevez A.G.; Beckman, J. S. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res. Rev.* 2004, 47, 263– 274.
- [2] Liscic R. M.; Breljak D. Molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry.* 2011, 35 (2), 370-372.
- [3] Matsuoka, Y.; Rakonczay, Z.; Giacobini, E.; Naritoku, D. L--Methylamino-Alanine induced behavioral changes in rats. *Pharmacology Biochem. Behavior.* 1993, 44, 727-734.
- [4] Pérez, D. I.; Conde, S.; Pérez, C.; Gil, C.; Simon, D.; Wandosell, F., Moreno F. J.; Luque, F. J.; Gelpí, J.L., Martínez, A. Thienylhalomethylketones: Irreversible GSK-3 inhibitors as useful pharmacological tools. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 6914-6925.
- [5] Pérez, D. I.; Palomo, V.; Pérez, C.; Gil, C.; Dans, P. D.; Luque, F. J.; Conde, S.; Martinez, A. Switching reversibility to irreversibility in glycogen synthase kinase 3 inhibitors: clues for specific design of new compounds. *J. Med. Chem.* 2011, doi: 10.1021/jm1016279

PÓSTER EN EL “XXXIV CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2011, EN BARCELONA.

**“Efecto neurotóxico del  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina en cultivos neuronales”**

*Begoña G. Miguell, Rosa M. Arahuetes<sup>2</sup>, Emma Muñoz-Saez<sup>1</sup>, Estefanía de Munck<sup>2</sup>, Irene Ojeda<sup>2</sup> y Ana M. Martínez<sup>1</sup>.*

*1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

*2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurológica de causa aún desconocida y evolución clínica muy variable, que se manifiesta con degeneración progresiva de las motoneuronas. Se estima que más del 90% de los afectados padece la forma esporádica de la enfermedad que se presenta con una elevada incidencia entre determinados grupos de la población. El denominador común de todos estos casos parece ser el efecto neurotóxico de un aminoácido el  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA). El aminoácido en presencia de bicarbonato genera un aducto carbamylado similar al glutamato, neurotransmisor excitatorio implicado en la patogénesis de la ELA. El LBMAA llega al cerebro a través del transportador de aminoácidos neutros de la barrera hematoencefálica y actúa sobre los receptores glutamatérgicos: AMPA, NMDA y mGluR1 y en mGluR5. El presente estudio está dirigido a conocer la acción del L-BMAA en diferentes parámetros de la actividad neuronal, utilizando cultivos celulares de neuronas SH-SY5Y. Los resultados obtenidos indican, en primer lugar, que el L-BMAA produce un descenso significativo de la viabilidad neuronal, el cual depende de la dosis utilizada. Experimentos llevados a cabo en presencia de inhibidores específicos demuestran la implicación de diferentes isoformas de PKC en la viabilidad de estas neuronas, concretamente las isoformas PKC  $\zeta$  y PKC  $\delta$  fundamentalmente. Asimismo, se pudo concluir que el tratamiento con L-BMAA da lugar también a un importante incremento en la producción de ROS y de calcio citosólico. También se ha detectado despolarización de la membrana mitocondrial y variación de los niveles de calcio intramitocondriales. Estos efectos son compatibles con las disfunciones que se

detectan en los enfermos de ELA y pueden representar un punto de partida para validar un modelo de estudio de la enfermedad.

PÓSTER EN EL “6TH EUROPEAN CONGRESS OF PHARMACOLOGY”  
CELEBRADO EN JULIO DE 2012, EN GRANADA.

**“Effect of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat”**

*Estefanía de Munck 1, Emma Muñoz 1, María Teresa Antonio 1, Javier Pineda 1, Amparo Herrera 1, Begoña G. Miguel 2, Rosa María Arahuetes 1.*

*1-Universidad Complutense de Madrid, Fisiología Animal II, 28040, Spain.*

*2-Universidad Complutense de Madrid, Bioquímica y Biología Molecular I, 28040, Spain.*

The relationship between  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) and high rates of amyotrophic lateral sclerosis/Parkinson's disease complex (ALS/PDC) was first identified in the island of Guam. This neurotoxin is a naturally occurring, non-protein amino acid found in the majority of cyanobacterial genera tested. Evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders relies on its bioaccumulation and biomagnification through food chain. Uptake and accumulation of free L-BMAA by various non-symbiotic organisms, including aquatic macrophytes, has been documented but to date only a few ecotoxicological investigations have been published. The involvement of L-BMAA in oxidative stress has been demonstrated in several studies in the central nervous system of animals treated with this neurotoxin. In the present study, we investigate the effect of L-BMAA xenobiotic agent on the oxidative stress responses of liver and kidney in rats treated by intraperitoneal administration of 6 consecutive doses of L-BMAA (250 mg/kg). All experiments were performed in rats *Rattus norvegicus*, albinus variety, which were provided by Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). Control and treated groups were composed by 10 male rats and 10 female rats each one. Oxidative stress is demonstrated by the quantification of lipid peroxidation expressed in the production of thiobarbituric-malondialdehyde complex, the measurement of catalase and glutathione peroxidase activities, as well as the quantification of glutathione (GSH) levels and the total antioxidant capacity. We observed that L-BMAA caused a significant increase in the degree of lipid peroxidation and catalase activity in both organs. A significant increase in glutathione peroxidase activity was only obtained in liver, whereas glutathione levels were also increased in both organs. The total antioxidant capacity decreased in liver and increased in kidney. Our results show that L-BMAA administration produces oxidative damage in liver and

kidneys, as strongly suggested by the significant increase of TBARS and the high catalase activity. In addition, the liver seems to be more susceptible to the L-BMAA toxic action than the kidneys, perhaps due to detoxification processes. Finally, given the evidences for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders like ALS, these results may be useful for future studies with L-BMAA treated rats. Our study suggests that oxidative stress generated by the administration of this substance in liver and kidney, although significant, is not enough to affect the functionality of the first one, which facilitates its use in experimental animals to contribute to the clarification of the pathogenesis of this disease. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between control and treated groups. The male and female data were analysed individually. The differences between means were tested by Bonferroni's multiple range tests. A value of  $p < 0.05$  was chosen as the minimal level of statistical significance.

PÓSTER EN EL “22ND IUBMB AND 37TH FEBS CONGRESS” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2012, EN SEVILLA.

**“Action of  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma”**

Emma Muñoz<sup>1</sup>, Estefanía de Munck<sup>2</sup>, Rosa M. Arahuetes<sup>2</sup>, Ana M. Martínez<sup>1</sup>, Begoña G. Miguel<sup>1</sup>.

*1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

*2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid that has been related to various neurodegenerative diseases. Taking into account that both glycogen synthase kinase-3 (GSK3) and (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43) have been described as possible neurodegenerative disease hallmarks, the main goal of this study was analyze whether the treatment with L-BMAA produces alterations in both biomarker proteins. The experiments were performed in human neuroblastoma cells SH-SY5Y. In all experiments, cells were incubated for 24 hour with 10 mM L-BMAA. Western blots showed a discrete increase in GSK3  $\alpha/\beta$  in cellular total extracts. When the nuclear fraction was analyzed, a significant increase in GSK3 $\beta$  was observed, without appreciates any decline in the levels of these proteins in the cytosol. GSK3 $\beta$  has been established as an antiapoptotic regulator of death receptor-induced extrinsic apoptosis, but this protective action occurs when GSK3 $\beta$  is located in the cytosol. Under basal conditions, GSK3 $\beta$  is mostly cytosolic and associated with multiprotein complexes, which are their substrates. After stimulation, GSK3 $\beta$  is released from protein anchors and it is translocated to nucleus, where it is highly active and has been involved in important cellular functions achieved by GSK3 phosphorylation of numerous transcription factors and produces cellular death. Therefore, our results indicate that the toxicity of LBMAA implies both an increase of GSK3 $\beta$  synthesis and a GSK3 $\beta$  translocation to the nucleus, as part of its action producing cell death. Our results also indicated that L-BMAA cause an increase in TDP-43 and alterations in its structure, giving rise to the formation of aggregates of TDP-43 without nuclear TDP-43



depletion. This study demonstrated that L-BMAA leads the increase of GSK3 and TDP-43, two possible biomarkers for neurodegenerative diseases.

PÓSTER EN EL “XXXVI CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR” CELEBRADO EN SEPTIEMBRE DE 2013, EN MADRID.

**“ $\beta$ -N-methylamino-L-alanine causa la formación de agregados patológicos de TDP-43 en un modelo animal de esclerosis lateral Amiotrófica”**

*Emma Muñoz-Saez<sup>1</sup>, Estefanía de Munck<sup>2</sup>, Rosa M. Arahuetes<sup>2</sup>, Ana M. Martínez<sup>1</sup>, Begoña G. Miguel<sup>1</sup>.*

*1-Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

*2-Departamento de Biología Animal II, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

El  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (L-BMAA) es un aminoácido neurotóxico que ha sido relacionado con algunas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Estudios recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio, basados en el tratamiento con L-BMAA, han dado lugar al diseño de un modelo animal de ELA esporádica que ha sido objeto de una patente.

Por otro lado, hay que destacar que (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43), es un factor de transcripción relacionado con patologías neurodegenerativas. En condiciones normales esta proteína está localizada en el núcleo, con escasa presencia en el citosol. Los enfermos de ELA presentan, en el citosol celular, agregados patológicos de esta proteína que son tau negativos y ubiquitina positivos, lo cual podría indicar que TDP-43 pueda considerarse como un biomarcador de la enfermedad.

El presente estudio se ha llevado a cabo en ratas tratadas intraperitonealmente con L-BMAA durante 5 días consecutivos, tiempo suficiente para provocar en los animales alteraciones neurológicas significativas, compatibles con las observadas en enfermos de ELA. La evaluación neurológica de los animales así como la funcionalidad muscular y el control motor se realizaron semanalmente mediante pruebas estándar. Después de 90 días de tratamiento, se analizaron la corteza motora y la médula lumbar por microscopía electrónica, para comprobar la afectación de las motoneuronas. En paralelo, se analizó la presencia de agregados que contienen TDP-43 y ubiquitina, mediante doble inmunofluorescencia con anticuerpos específicos anti-TDP-43 y anti-ubiquitina.

Los datos obtenidos a partir de imágenes de microscopía confocal demuestran que el tratamiento con L-BMAA da lugar a agregados patológicos de TDP-43 en el citosol de neuronas motoras de corteza cerebral y de médula lumbar que colocalizan con ubiquitina como ocurre en los enfermos de ELA.

Estos resultados por una parte avalan el modelo animal utilizado y, por otra, estarían de acuerdo con el papel que TDP-43 pueda tener como marcador de la enfermedad.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap)

# Effect of $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on oxidative stress of liver and kidney in rat

Estefanía de Munck<sup>a</sup>, Emma Muñoz-Sáez<sup>a</sup>, María Teresa Antonio<sup>a</sup>, Javier Pineda<sup>a</sup>, Amparo Herrera<sup>a</sup>, Begoña G. Miguel<sup>b</sup>, Rosa María Arahuetes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Animal Physiology II, Faculty of Biological Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid 28040, Spain

<sup>b</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology I, Faculty of Chemical Sciences, Complutense University of Madrid (UCM), Madrid 28040, Spain

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 26 July 2012

Received in revised form

5 December 2012

Accepted 7 December 2012

Available online 20 December 2012

### Keywords:

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine  
(L-BMAA)

Oxidative stress

Liver

Kidney

## ABSTRACT

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid, found in the majority of cyanobacterial genera tested. Evidence for implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, like amyotrophic lateral sclerosis (ALS), relies on bioaccumulation and biomagnification from symbiotic cyanobacteria. The involvement of L-BMAA in oxidative stress was demonstrated in several studies in the central nervous system. In the present study, we investigated the effect of L-BMAA on the oxidative stress responses of liver and kidney in rats treated by intraperitoneal administration with this amino acid. Oxidative stress was demonstrated by the quantification of lipid peroxidation, the measurement of both catalase and glutathione peroxidase activities, as well as the quantification of glutathione (GSH) levels and the total antioxidant capacity. It was observed that L-BMAA caused a significant increase in the degree of lipid peroxidation and catalase activity in both organs. A significant increase in glutathione peroxidase activity was obtained only in liver, whereas glutathione levels were also increased in both organs. The total antioxidant capacity decreased in liver and increased in kidney. These results suggest that the oxidative stress was higher in liver than in kidney, and might be crucial for L-BMAA toxicological action.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a highly neurotoxic non-protein and non-lipophilic amino acid, found in the majority of cyanobacterial genera tested (Cox et al., 2005). The association of neurodegenerative diseases (ALS, Parkinsonism dementia) with chronic exposition to amino acid L-BMAA has been suggested in the past (Papapetropoulos, 2007). Epidemiological studies linked traditional diet in the population of Guam islands with high incidence of neurological diseases, which were more than a hundred times more prevalent on Guam islands than any other parts of the world (Banack

et al., 2006; Borenstein et al., 2007). L-BMAA is produced by the cyanobacteria and its detection has been reported worldwide in a variety of aquatic and terrestrial environments, suggesting that it is ubiquitous (Cox et al., 2003, 2005).

Evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders relies on its bioaccumulation and biomagnification through food chain (Murch et al., 2004). Uptake and accumulation of free L-BMAA by various non-symbiotic organisms, including aquatic macrophytes (Esterhuizen et al., 2011), has been documented but to date only a few ecotoxicological investigations have been published (Purdie et al., 2009; Lüring et al., 2011).

\* Corresponding author. Tel.: +34 913944987; fax: +34 913944935.

E-mail address: [rporterio@bio.ucm.es](mailto:rporterio@bio.ucm.es) (R.M. Arahuetes).

1382-6689/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.12.004>

Since L-BMAA has been linked to neurodegenerative diseases, these results may have important relevance to human health. The discovery of regular biosynthesis of the neurotoxin L-BMAA in a large temperate aquatic ecosystem combined with its possible transfer and bioaccumulation within major food webs, some ending in human consumption, is alarming and requires attention (Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010). Mondo et al. (2012) suggest that consumption of shark fins may increase the risk for human exposure to the cyanobacterial neurotoxin L-BMAA, a neurotoxic amino acid which accumulates in biological tissues.

Limited information exists on the metabolism of L-BMAA other than oxidation by L-aminoacid oxidase (Hashmi and Anders, 1991) and that the  $\alpha$ -N-acetyl derivative, conjecturally formed by N-acetylation by acetyl-CoA, is excreted by rats treated with L-BMAA (Reece and Nunn, 1989). L-BMAA is converted to methylamine in rat liver and kidney preparations (Nunn and Ponnusamy, 2009). The significance of this conversion being that chronic administration of methylamine to rats causes oxidative stress.

Given the evidence for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, and its ability to generate oxidative stress, in this paper we investigated the effect of L-BMAA on the oxidative stress responses of liver and kidney responsible for its metabolism and excretion. Oxidative stress was measured by quantification of lipid peroxidation, as well as both catalase and glutathione peroxidase activities, GSH levels and total antioxidant capacity in both organs.

We have seen in laboratory rats treated with L-BMAA one month after birth, showed symptoms of neurological disorders six months later. For this reason we were interested to know more about the state of the animals, and so we set out to determine the degree of oxidative stress in liver and kidney.

## 2. Materials and methods

All experiments were performed in males and females Wistar rats, *Rattus norvegicus*, albinus variety, which were provided by Harlan Interfauna Ibérica S.A. (Barcelona, Spain). The animals were maintained at a constant temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and in a reverse 12 h dark/light cycle (lights on at 20:00 h), with free access to food (commercial diet for rodents A04; Panlab, Barcelona, Spain) and water. The Animal Ethical Committee of University Complutense (Madrid, Spain) approved the experimental protocol. At their arrival, the rats were housed in standard laboratory cages, and acclimatized to the environmental conditions during two weeks. After this period, they were divided into two groups and maintained under the supervision of a licensed veterinarian in accordance with the principles set forth in the National Institute of Health guide for the care and use of laboratory animals.

### 2.1. Experimental groups

Group 1: Control animals, males and females.

Group 2: Experimental animals (males and females), one month old and weighing 50 g, are injected intraperitoneally with a daily L-BMAA (Sigma–Aldrich) dose of 250 mg/kg for consecutive 5 days.

This dosage was chosen following a review of the works of Polsky et al. (1972) and Seawright et al. (1990), in which, with a single high dose of L-BMAA (between 700 and 4000 mg/kg) were observed acute effects of toxin, while chronic 500 mg/kg per day dose over several days produced a cumulative effect leading to intoxication (Seawright et al., 1990).

The rats treated with L-BMAA under the above conditions, at the age of 7 months (6 months post-treatment) showed neurotoxic effects (motor and coordination impairment). To determine the affectation in L-BMAA treated animals, we have developed a neurological testing scale based on: animal ambulation, the tail suspension test and a strength test. The scale was evaluated from 0 to 10. The symptoms began in the first month after treatment with L-BMAA.

Control animals, which neurological evaluation was 0, showed these features: (1) they walked correctly stepping with all the foot sole, (2) referring to tail suspension test, control animals described a perfect “T” form with their forepaws respect to the principal body axis and (3) they responded with strength to a tail pull, without hindlimbsplay.

Animals treated with L-BMAA, which neurological evaluation was 7, showed these features: (1) they walked without stepping with all the foot sole, showing lateralization and bad body position, (2) they could not maintain the right “T” form in the tail suspension test, their hind limbs were relaxed and closer together and (3) they did not respond with strength to a tail pull, with hindlimbsplay.

Treated animals at 6 months post-treatment presented an assessment between 6 and 7. At this point, control and treated animals were sacrificed and liver and kidneys were rapidly removed and kept at  $-80^\circ\text{C}$  until further analysis. Each group has at least 10 males and 10 females.

### 2.2. Lipid peroxidation assay

Lipid peroxides were estimated in kidney and liver samples by thiobarbituric acid (TBA) reaction with malondialdehyde (MDA), a product formed due to the peroxidation of membrane lipids, according to the method described by Ohkawa et al. (1979). Lipid peroxidation was expressed as nM of MDA formed/g of fresh tissue.

### 2.3. Enzyme assay

Catalase (CAT) activity was estimated in liver and kidneys by measuring the decrease in absorbance of oxygen peroxide at 240 nm, following the method described by Aebi (1984). Alkaline phosphatase (ALP) and acid phosphatase (ACP) activity were assayed in the homogenates of liver and kidney following the p-nitrophenol method (Kufitinec and Miller, 1972), aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) activities were assayed in liver samples spectrophotometrically (505 nm) according to the standard procedures using commercially available diagnostic kits (Sigma diagnostics). Glutathion peroxidase (GPx) activity was recorded (412 nm) using a diagnostic kit of Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, based on the reduction of GSH and  $\text{H}_2\text{O}_2$  by this enzyme.

## 2.4. Biochemical analysis

All parameters were assayed in liver homogenates with the commercial kits SPINREACT (BIO ANALITICA S.L., MADRID): albumin by Bromocresol test; cholesterol and triglycerides by colorimetric–enzymatic tests based on Trinder's reaction (condensation of 4-amino-antipyrin with phenol in presence of  $H_2O_2$  and peroxidase to yield a red chinonimine dye). Protein content was also determined in the homogenates (Lowry et al., 1951). Reduced glutathione (GSH) content in both liver and kidney was determined by the method of Ellman (Ellman, 1959), using 5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) as reagent. Oxidized glutathione (GSSG) was measured using a Glutathione Assay Kit provided by MBL (Medical and Biological Laboratories Co., Ltd.). Finally, total anti oxidative capacity was estimated in liver and kidney samples by a kit provided by Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, based on the capacity of antioxidants of reducing  $Fe^{3+}$  to  $Fe^{2+}$ , which can be combined with phenantrene and produce a final compound measurable at 520 nm.

## 2.5. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (in tables) or mean  $\pm$  standard error of the mean (in figures). Analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between control and treated groups. Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether significant differences existed between groups according to sex and treatment. The differences between means were tested by Bonferroni's multiple range tests. A value of  $p < 0.05$  was chosen as the minimal level of statistical significance.

## 3. Results

The study begins with an analysis of the liver profile of the rats treated, in order to know the effects induced by the xenobiotic agent in this organ. Table 1 shows that the hepatic protein content is increased in both males ( $F = 7.95$ ,  $p < 0.05$ ) and females ( $F = 18.68$ ,  $p < 0.01$ ), whereas albumin decreases significantly only in females ( $F = 14.79$ ,  $p < 0.01$ ). Cholesterol levels are increased only in females ( $F = 5.57$ ,  $p < 0.05$ ). Finally, we noted that in the liver enzymes evaluated, only the acid phosphatase (AcP) is significantly increased and in greater proportion in females ( $F = 70.2$ ,  $p < 0.01$ ) than in males ( $F = 9.13$ ,  $p < 0.05$ ). No changes were observed in transaminases activities.

There was no significant difference in total oxidative stress between the sexes either in liver or in kidney.

Our results show that L-BMAA causes in rat liver, both males and females, a significant increase in the degree of lipid peroxidation ( $F = 12.76$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 6.2$ ,  $p < 0.05$  respectively) (Fig. 1), as well as in the activity of the enzymes catalase ( $F = 21.02$ ,  $p < 0.01$  and  $F = 7.4$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2) and glutathione peroxidase (only in males  $F = 18.25$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 3). Glutathione levels were increased in both sexes, ( $F = 44.8$ , and  $F = 15.4$ , respectively;  $p < 0.01$ ) (Fig. 4). Given the large increase in GSH levels in the liver, the values of GSSG have been

measured in this organ and, as could be expected since the GPx activity was increased in the treated animals, we found an increase of GSSG compared to the values measured in the control group (males:  $F = 41.35$ ,  $p < 0.001$ ; females:  $F = 10.27$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 4). On the other hand, it is important to note the significant decrease suffered in the total hepatic antioxidant capacity in males ( $F = 127.69$ ,  $p < 0.01$ ), and females ( $F = 72.18$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 5).

The results obtained in the kidneys of animals treated with L-BMAA (Figs. 1–5), show a significant increase in the level of lipid peroxidation (only in males:  $F = 5.69$ ,  $p < 0.05$ ), in catalase activity (males:  $F = 37.54$ ,  $p < 0.01$ ; females:  $F = 6.75$ ,  $p < 0.05$ ), and glutathione levels (only in males:  $F = 10.42$ ,  $p < 0.05$ ). But, unlike what happens in the liver, glutathione peroxidase activity declines significantly (males:  $F = 10.1$ ,  $p < 0.05$ ; females:  $F = 6.66$ ,  $p < 0.05$ ), while the total antioxidant capacity is increased (males:  $F = 7.26$ ,  $p < 0.05$ ; females:  $F = 25.65$ ,  $p < 0.01$ ) in the kidneys of both sexes L-BMAA treated rats.

## 4. Discussion

Cyanobacteria are ubiquitous and many of the species examined so far have been shown to produce the neurotoxic non-protein amino acid L-BMAA. Since human exposure to xenobiotic L-BMAA appears to be widespread, there is a potential to be a major environmental factor capable of causing ALS and other neurodegenerative diseases throughout the world (Bradley and Mash, 2009).

When the xenobiotic is subjected to the process of metabolism, this occurs through one or more enzymes of the antioxidant system. As it was mentioned above, L-BMAA is converted to methylamine in rat liver and kidney preparations (Nunn and Ponnusamy, 2009). The most important organ in this biotransformation is the liver, both in a qualitative and quantitative way, because it contains high levels of enzymes and other compounds that metabolize drugs, and because it quickly takes up xenobiotics from the blood (Guengerich, 1984). Moreover, kidney is mainly responsible of its excretion. Therefore, we investigated the effect of L-BMAA in these organs.

Several useful markers were chosen to assess liver damage (Table 1). The increase in the activity of alkaline and acid phosphatases as well as transaminases is within the widely understood parameters of liver adaptation to damaging factors (Satyalatha and Vardhani, 2005). In our study, a significant increase in hepatic protein content was detected, a fact probably related to the induction of detoxification enzymes (Valko et al., 2007). Moreover, the ACP activity also increased. ACP is used as an indicator of structural damage in the tissues caused by the increase in lysosomal activity resulting in cellular degeneration and necrosis (Teijón et al., 2006). In view of the results obtained, the administration of L-BMAA appears not to have harmful effects on liver function.

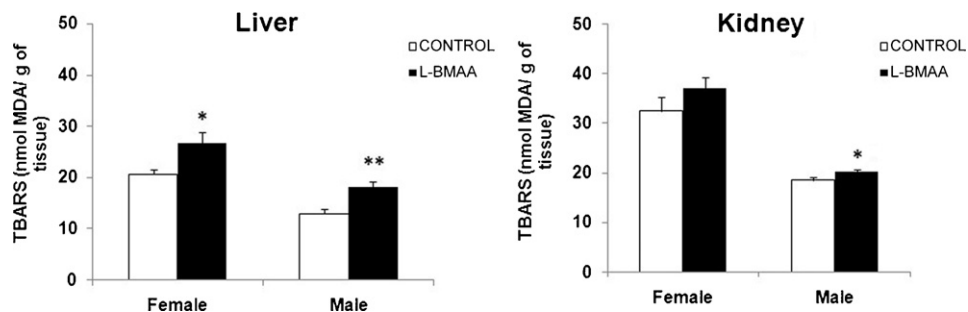
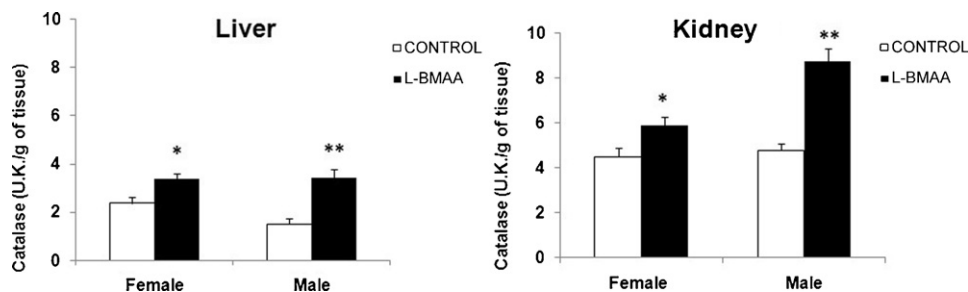
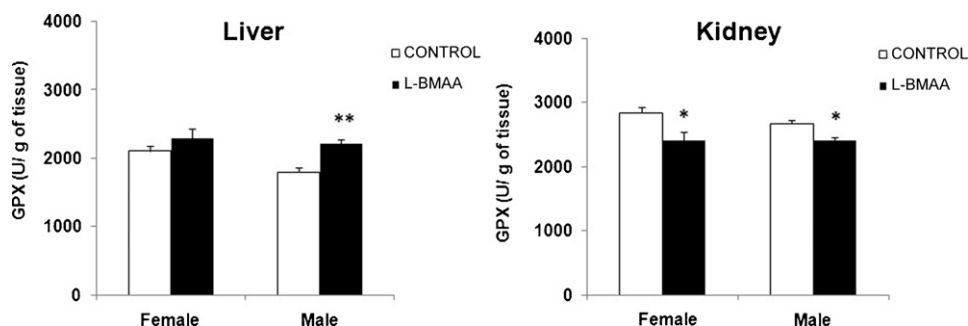
The involvement of L-BMAA in oxidative stress has been shown in several studies (Lobner et al., 2007; Liu et al., 2009), and this may be one mechanism by which it exerts its harmful effect. Oxidative stress is produced by disruption of the balance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems in the body. ROS such as hydrogen peroxide

**Table 1 – Effect of L-BMAA administration on some biochemical hepatic parameters. All values are expressed in mean  $\pm$  SD (n = 7).**

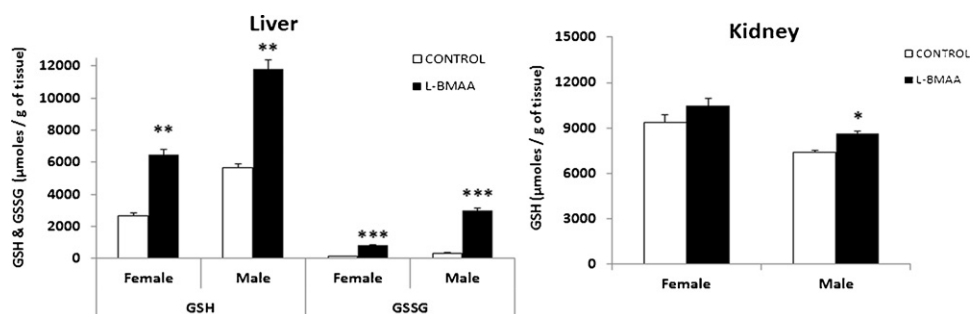
	Females		Males	
	Control	L-BMAA	Control	L-BMAA
Proteins (mg/g)	218 $\pm$ 7	279 $\pm$ 34**	198 $\pm$ 14	222 $\pm$ 14*
Albumin (mg/g)	132 $\pm$ 19	94 $\pm$ 16**	121 $\pm$ 14	105 $\pm$ 26
Cholesterol (mg/g)	1.88 $\pm$ 0.27	2.51 $\pm$ 0.65*	1.64 $\pm$ 0.34	1.64 $\pm$ 0.35
Triglycerids (mg/g)	9.13 $\pm$ 3	12.57 $\pm$ 2.62	11.55 $\pm$ 2.62	14.24 $\pm$ 2.05
AST (U/g)	1.41 $\pm$ 0.11	1.47 $\pm$ 0.19	1.31 $\pm$ 0.08	1.29 $\pm$ 0.1
ALT (U/g)	1.32 $\pm$ 0.11	1.28 $\pm$ 0.15	1.22 $\pm$ 0.02	1.2 $\pm$ 0.06
AcP (U/g)	1.58 $\pm$ 0.17	2.43 $\pm$ 0.21**	1.82 $\pm$ 0.49	2.52 $\pm$ 0.36*
ALP (U/g)	0.67 $\pm$ 0.24	0.9 $\pm$ 0.32	1.77 $\pm$ 0.62	2.04 $\pm$ 0.31

\* Indicates difference at p-value &lt;0.05 from control group.

\*\* Indicates difference at p-value &lt;0.01 from control group.

**Fig. 1 – Effect of L-BMAA administration on the TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean  $\pm$  SEM (n = 7). \*, \*\* indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.****Fig. 2 – Effect of L-BMAA administration on the catalase activity of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean  $\pm$  SEM (n = 7). \*, \*\* indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.****Fig. 3 – Effect of L-BMAA administration on the GPx activity of hepatic and renal tissue. All values are expressed in mean  $\pm$  SEM (n = 7). \*, \*\* indicates difference at p-value <0.05, <0.01, respectively from control group.**





**Fig. 4 – Effect of L-BMAA administration on the GSH and GSSG concentration of hepatic tissue and GSH concentration in renal tissue.** All values are expressed in mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). \*, \*\*, \*\*\* indicates difference at  $p$ -value  $< 0.05$ ,  $< 0.01$ ,  $< 0.001$ , respectively from control group.

( $H_2O_2$ ), superoxide ( $O_2^-$ ) and hydroxyl ( $OH^-$ ) radicals are produced in cells as a result of metabolic processes (Vlahogianni et al., 2007). These ROS may induce cell damage by stimulation of lipid peroxidation (LPX) of cell membranes. Thus, cells require antioxidant systems such as glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), among others, to counteract the effects of ROS (Sinha et al., 2007). Therefore, a balance between pro-oxidant/antioxidant molecules and ROS scavenging is crucial to maintain cellular homeostasis.

To the best of our knowledge, this study is the first to examine the development of oxidative stress in the liver and kidney in rats, six months after treatment with L-BMAA. We have found high oxidative damage in liver and, to a lesser extent, in kidney.

In the present study, increased oxidative stress produced as a result of L-BMAA treatment is well marked by the enhanced TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) production in liver and kidney. Lipid damage was observed in rat liver in both females and males, with an increase in MDA levels of 31.7% and 39.8% respectively, compared with levels measured in control animals. Furthermore, we detected a trend toward increased levels of MDA in the kidneys of female rats, while this increase is significant only in male rats.

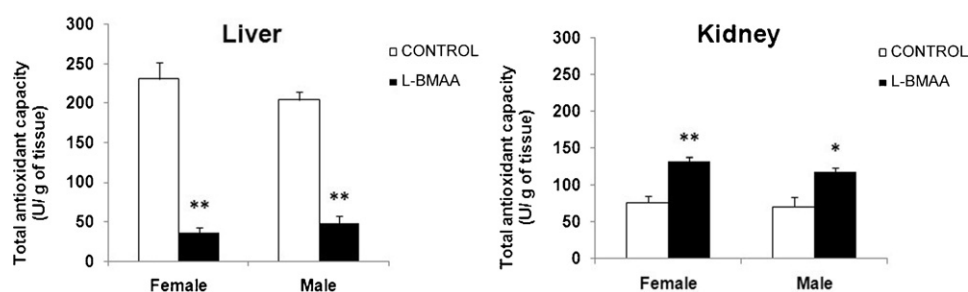
We found that oxidative lipid damage coincides with motor symptoms of the affected animal by treatment with L-BMAA. The data obtained about lipid peroxidation in the liver are in agreement with Miana-Mena et al. (2011), who also described oxidative lipid damage in the liver of the SODG93A mouse,

an animal model of ALS, which is already showing significant symptoms of motor system disorders.

Usually the harmful effects of oxidative stress are counteracted by natural defense mechanisms that involve enzymes like catalase and glutathione peroxidase. In our experiment, the activity of the catalase and glutathione peroxidase enzymes are significantly elevated in the liver of male rats treated (129.5% and 29.1%) and, to a lesser extent, in the liver of females (43.2% and 8.5%). It can be suggested that the enhancement of the antioxidant defense is a normal response to increase the detoxification process in these organs (Valko et al., 2007). This fact, together with the decrease in antioxidant total capacity in this organ and high lipid peroxidation, indicates that the liver suffers oxidative stress in response to the L-BMAA action.

On the other hand, the analysis conducted in the kidney demonstrated in both males and females that the activity of catalase, but not of glutathione peroxidase, is augmented. This fact, together with the increase in total antioxidants and less increase in the MDA amount in treated animals, could indicate that the kidney suffers a lower degree of oxidative stress than the liver. One possible explanation for this fact is, as happens with other xenobiotics (Henke, 2009), its metabolic intermediates may have a higher toxicity than the compound in its native form, and the liver being the only that is exposed to these transitional forms.

Glutathione plays a major role in maintaining intracellular redox state and acts as antioxidant by detoxifying a number of toxic metals, drugs and xenobiotics (Meister and Anderson,



**Fig. 5 – Effect of L-BMAA administration on the total antioxidant capacity of hepatic and renal tissue.** All values are expressed in mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$ ). \*, \*\* indicates difference at  $p$ -value  $< 0.05$ ,  $< 0.01$ , respectively from control group.



1983). In the liver of male and female rats treated with the toxin, the GSH levels were more than the double than in control animals. In addition, the GSSG levels were also increased in treated animals.

When cells are exposed to increased levels of oxidative stress, GSSG will accumulate and the ratio of GSH to GSSG will decrease. Therefore, the determination of the GSH/GSSG ratio and the quantification of GSSG are useful indicators of oxidative stress in cells and tissues.

The most interesting part of these results founded in liver was that increased values of GSSG caused a considerable drop in the GSH/GSSG ratio. For females the ratio decreased by 60% compared to control animals and in the case of males the decrease was 76%. These results highlighted the marked oxidative stress that occurs in this organ by L-BMAA effects.

This last fact, together with the depletion of total antioxidants, enhanced lipid peroxidation and the increase of catalase and glutathione peroxidase enzymes activity could indicate the strong oxidative stress presented in this organ, which is, at least partially, offset by the protective effect of GSH.

In the kidney of these animals, there was an increase in GSH of only 14%. This low increase in glutathione could be offset by the high levels of total antioxidants (70%) and a minor lipid peroxidation.

It has been described in sub-acute xenobiotic administration, which produces oxidative stress (Maiti and Chatterjee, 2000), that the liver seems to be more protected than the kidneys by a rise in antioxidant compounds, such as glutathione. However, further studies are needed to confirm the possible protective effect of glutathione in the action of L-BMAA on the antioxidant defense system of the liver and the kidney.

## 5. Conclusions

Our results show that L-BMAA administration produces oxidative damage in liver and kidney, suggested by the significant increase of lipid peroxidation and high catalase activity. On the other hand, the liver seems to be more susceptible to the L-BMAA toxic action than the kidney, perhaps due to detoxification processes. Finally, given the evidences for the implication of L-BMAA in neurodegenerative disorders, our study suggests that oxidative stress generated in the liver and kidney, although it is important, does not compromise the animal's life, which could promote its use in experimental animals in order to know more about the neurodegenerative diseases events.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgement

This work was supported by the following grant: PPT-300000-2009-11 from the MEDINA Foundation.

## REFERENCES

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Banack, S.A., Murch, S.J., Cox, P.A., 2006. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *J. Ethnopharmacol.* 106, 97–104.
- Borenstein, A.R., Mortimer, J.A., Schofield, E., Wu, Y., Salmon, D.P., Gamst, A., Olichney, J., Thal, L.J., Silbert, L., Kaye, J., Craig, U.L., Schellenberg, G.D., Galasko, D.R., 2007. Cycad exposure and risk of dementia, MCI, and PDC in the Chamorro population of Guam. *Neurology* 68, 1764–1771.
- Bradley, W.G., Mash, D.C., 2009. Beyond Guam: the cyanobacteria/BMAA hypothesis of the cause of ALS and other neurodegenerative diseases. *Amyotroph. Lateral. Scler.* 10, 7–20.
- Brand, L.E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D.C., 2010. Cyanobacterial Blooms and the Occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* 1, 620–635.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., 2003. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13380–13383.
- Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (14), 5074–5078.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Esterhuizen, M., Pflugmacher, S., Downing, T.G., 2011.  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) uptake by the aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 74–77.
- Guengerich, F.P., 1984. Effects of nutritive factors on metabolic processes involving bioactivation and detoxication of chemical. *Annu. Rev. Nutr.* 4, 207–231.
- Hashmi, M., Anders, M.W., 1991. Enzymatic reaction of beta-N-methylaminoalanine with L-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 1074, 36–39.
- Henke, K.R., 2009. *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*, 1st ed. John Wiley & Sons Ltd., United Kingdom.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9252–9257.
- Kuftinec, M.M., Miller, S.A., 1972. Alkaline and acid phosphatase activities during growth of long bones and mandibles. *Calcified Tissue Res.* 9, 173–178.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D., 2009. [beta]-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc<sup>-</sup>. *Exp. Neurol.* 217, 429–433.
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K., Peoples, R.W., 2007. [beta]-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 25, 360–366.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lüring, M., Faassen, E.J., van Eenennaam, J.S., 2011. Effects of the cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) on the survival, mobility and reproduction of *Daphnia magna*. *J. Plankton Res.* 33, 333–342.
- Maiti, S., Chatterjee, A.K., 2000. Differential response of cellular antioxidant mechanism of liver and kidney to arsenic

- exposure and its relation to dietary protein deficiency. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 8, 227–235.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 711–760.
- Miana-Mena, F.J., González-Míngot, C., Larrodé, P., Muñoz, M.J., Oliván, S., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., Reiter, R.J., Osta, R., García, J.J., 2011. Monitoring systemic oxidative stress in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol.* 258, 762–769.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A., Mash, D.C., 2012. Cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar. Drugs* 10 (2), 509–520.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., 2004. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 12228–12231.
- Nunn, P.B., Ponnusamy, M., 2009.  $\beta$ -N-methylaminoalanine (BMAA): metabolism and metabolic effects in model systems and in neural and other tissues of the rat in vitro. *Toxicol.* 54, 85–94.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Papapetropoulos, S., 2007. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.* 50 (7–8), 998–1003.
- Polsky, F.I., Nunn, P.B., Bell, E.A., 1972. Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Fed. Proc.* 31 (5), 1473–1475.
- Purdie, E.L., Samsudin, S., Eddy, F.B., Codd, G.A., 2009. Effects of the cyanobacterial neurotoxin [beta]-N-methylamino-L-alanine on the early-life stage development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 95, 279–284.
- Reece, D.M., Nunn, P.B., 1989. Synthesis of  $^{14}\text{C}$ -labelled L-a-amino- $\beta$  methylaminopropionic acid and its metabolism in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 17, 203–204.
- Satyalatha, B.D., Vardhani, V.V., 2005. Liver phosphatases in mice treated with lead during murine ancylostomiasis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 134–136.
- Seawright, A.A., Brown, A.W., Nolan, C.C., Cavanagh, J.B., 1990. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, Lbeta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16 (2), 153–169.
- Sinha, S., Mallick, S., Misra, R.K., Singh, S., Basant, A., Gupta, A.K., 2007. Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176–187.
- Teijón, C., Olmo, R., Blanco, D., Romero, A., Teijón, J.M., 2006. Low doses of lead: effects on reproduction and development in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 111, 151–165.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361–1371.

Letter

## $\beta$ -N-methylamino-L-alanine induces changes in both GSK3 and TDP-43 in human neuroblastoma

Emma Muñoz-Saez<sup>1</sup>, Estefanía de Munck<sup>2</sup>, Rosa M. Arahuetes<sup>2</sup>, M. Teresa Solas<sup>3</sup>,  
Ana M. Martínez<sup>1</sup> and Begoña G. Miguel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

(Received January 3, 2013; Accepted March 11, 2013)

**ABSTRACT** —  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid produced by most cyanobacteria, which are extensively distributed in different environments all over the world. L-BMAA has been linked to a variety of neurodegenerative diseases. This work aims to analyze the toxicological action of L-BMAA related to alterations observed in different neurodegenerative illness as Alzheimer disease and amyotrophic lateral sclerosis. Our results demonstrate that neuroblastoma cells treated with L-BMAA show an increase in glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) and induce accumulation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) truncated forms (C-terminal fragments), phosphorylated and high molecular weight forms of TDP-43, that appears frequently in some neurodegenerative diseases.

**Key words:**  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, Glycogen synthase kinase-3, TAR DNA-binding protein

### INTRODUCTION

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is routinely described in the literature as a neurotoxin, which is produced by most cyanobacteria (Lee and McGeer, 2012). In the last few years L-BMAA has become relevant, because it has been related to several neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex (ALS-PDC), Alzheimer disease (AD) and ALS (Holtkamp, 2012). Recent findings have demonstrated that glycogen synthase kinase-3 (GSK3) can play an important role in several disorders, AD in particular (Salcedo-Tello *et al.*, 2011). GSK3 exists as two isoforms, GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$ , which are inactivated by phosphorylation of Ser 21 (GSK3 $\alpha$ ) and Ser 9 (GSK3 $\beta$ ). This phosphorylation causes its inactivation and is the primary mechanism responsible for growth factor inhibition of this kinase (Sutherland *et al.*, 1993). Another important hallmark of neurodegenerative diseases is the formation of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) pathological aggregates. Under normal conditions, TDP-43 is predominantly located in the nucleus, but in pathological conditions is translocated to the cytosol and form aggregates (Brettschneider *et al.*, 2012). It has been found that this protein is the major component of tau negative and ubiquitin-positive inclusions that characterize some neurodegenerative diseases (Lee *et al.*, 2011). Taking into account the role of GSK3 $\beta$  and TDP-43 as possible neurodegenerative disease hallmarks, the goal of this work is to know whether L-BMAA causes alterations in GSK3 $\beta$  and TDP-43 in neuroblastoma cells, in conditions under which L-BMAA produces neuronal death.

### MATERIALS AND METHODS

#### L-BMAA treatment and cell viability assay

SH-SY5Y human neuroblastoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and 1% glutamine in a humidified incubator in 95% air-5% CO<sub>2</sub> at 37°C. L-BMAA (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10 mM sodium bicarbonate. L-BMAA is added when cells reach 80% of confluence. Cellular viability was determined by MTT assay previously described (Alley *et al.*, 1988).

#### Subcellular fractionation, protein isolation and immunoblots

The human cell lines chosen for this study were SH-

Correspondence: Begoña G. Miguel (E-mail: begonnagomezmguel@gmail.com)

SY5Y cells. This cell line has been widely used as model of neurons, since these cells possess many biochemical and functional properties of neurons (Xie *et al.*, 2010). Cells treated with L-BMAA were resuspended in a ice-cold buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl), with protease inhibitor cocktail and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Lysated cells are considered as total extract. Nuclear and cytosolic fractions were obtained as described previously (Calcerrada *et al.*, 2002). Protein fraction (50 µg) was analyzed by SDS-PAGE on a 10% Tris-glycine gel. To examine the effect of L-BMAA on TDP-43, urea extraction was performed as previously described (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). Urea-fraction (100 µg of protein) was analyzed by using gradient PAGE on a 4-16% in a Tris-glycine gel.

To immunodetection analysis, gel electrophoresis were transferred to nitrocellulose, and probed with rabbit polyclonal primary antibodies: anti-GSK3  $\alpha/\beta$ , anti-*p*-GSK3 $\beta$ (Ser9), anti-ubiquitin and anti- $\alpha$ -tubulin (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-TDP-43 and anti-*p*S409/410 (ProteinTech Group, Chicago, IL, USA). Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody was purchased from ProteinTech Group. Digital images were acquired using a Fujifilm Intelligent Darkbox II (Fuji Systems USA, Stamford, CT, USA).

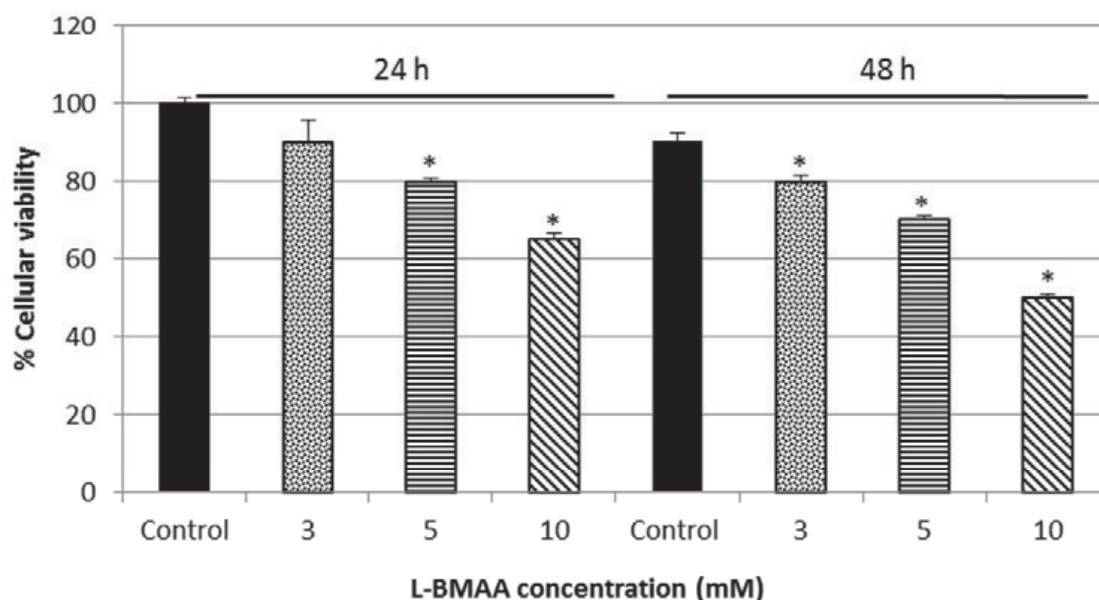
### Statistical analysis

Results are presented as means  $\pm$  S.D. in this article. The data from each biochemical experiment were analyzed separately and treated by ANOVA. Experiments were repeated three times with triplicate samples for each experiment. Student's *t*-test was also used to compare the samples. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant.

## RESULTS

To examine the action of L-BMAA on cell viability, SH-SY5Y cultures were treated with different amino acid concentrations for different times. Our results indicated that L-BMAA decreases cellular viability in a dose-response manner, being the maximal effect about a 32% (Fig. 1). Cell death was L-BMAA concentration dependent, increased with exposure time, resulting after 48 hr greater than 24 hr (Fig. 1).

Taking into account the important role of GSK3 $\beta$  in the neurodegenerative processes (Salcedo-Tello *et al.*, 2011), we analyzed the levels and the subcellular distribution of this enzyme after 10 mM L-BMAA treatment. Results showed an increase in GSK3 $\beta$  levels concomitant with a *p*-GSK3 $\beta$ (Ser9) decrease in cellular total extracts after L-BMAA treatment, this fact would indicate that an enzyme activation takes place. When the nuclear fraction was analyzed, an increase in GSK3 $\beta$  was observed, with-



**Fig. 1.** Effect of L-BMAA on SH-SY5Y neuroblastoma cell viability. Experiments are mean  $\pm$  S.D.\* Statistically significant difference from the corresponding control value ( $p \leq 0.05$ ).

## Action of L-BMAA on GSK3 and TDP-43 in neuroblastoma

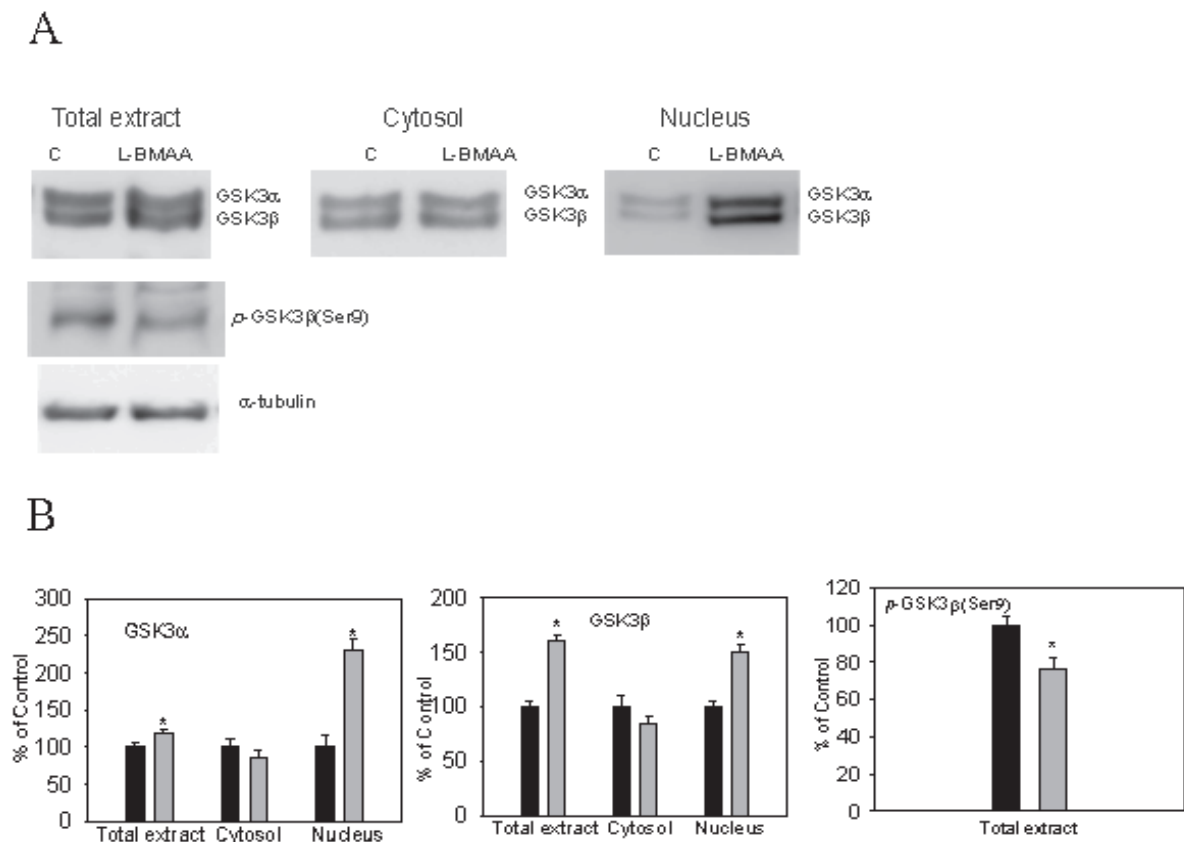
out any change in the cytosol (Fig. 2). In the same figure, it can be appreciated that an increase in nuclear GSK3 $\alpha$  occurs. Although in recent years GSK3 $\beta$  has been the main isoform related with neurodegeneration, GSK3 $\alpha$  has also been described to play a possible role in the pathological process such as ALS and AD (Chung *et al.*, 2008; Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011).

In order to determine whether L-BMAA treatment may result in altered forms of TDP-43, appearing frequently in neurodegenerative diseases forming pathological aggregates, high molecular weight, phosphorylated and truncated forms were analyzed. Our data indicated that the addition of L-BMAA caused an increase in insoluble TDP-43 and pS(409/410)TDP-43, together with the appearance of high molecular weight TDP-43 forms and insoluble 25 kD and 35 kD low molecular weight fragments of this

protein (Figs. 3A and 3C). Furthermore, the results also indicated that the addition of L-BMAA caused a high degree of protein ubiquitination (Fig. 3B). It is noteworthy that the presence of ubiquitinated inclusions has been reported as a hallmark of most adult onset neuropathological disorders (Yamamoto and Simonsen, 2011).

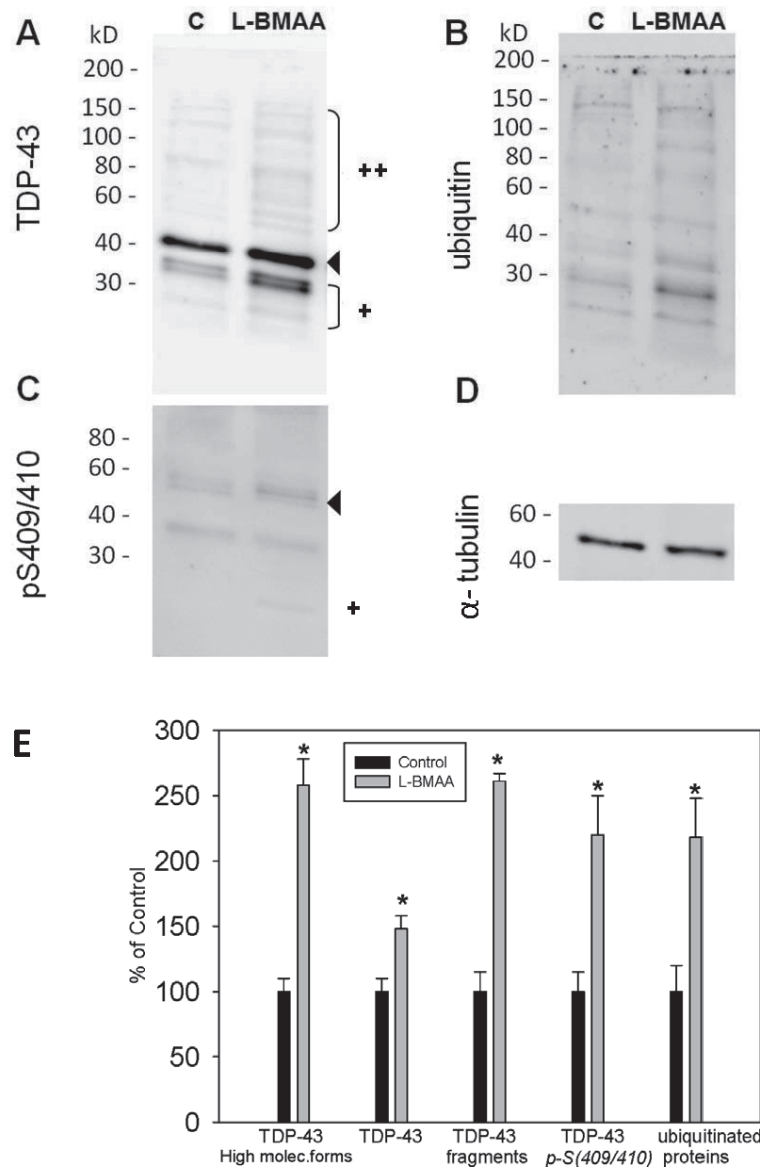
## DISCUSSION

Since the discovery of amino acid L-BMAA as neurotoxin, a great deal has been learned about its mechanism of action. The main mechanism of neurotoxicity of L-BMAA has been reported to be a receptor agonist of glutamate (Ross *et al.*, 1987; Chiu *et al.*, 2012). However, exactly how it causes neuronal death is not well understood. The finding that L-BMAA directly induces neu-



**Fig. 2.** Effect of L-BMAA on GSK3 $\alpha/\beta$  in SH-SY5Y neuroblastoma cells. A) Western blot of GSK3 $\alpha/\beta$  and p-GSK3 $\beta$ (Ser9) in total extract in untreated (C) and treated with 10 mM L-BMAA for 24 hr. Western blots of GSK3 $\alpha/\beta$  in cytosol and nucleus fractions are also shown. (B) Densitometric analysis of Western blots of GSK3 $\alpha/\beta$ . Protein bands were scanned and quantified using multigaue image software v 3.0. The blot was probed with anti  $\alpha$ -tubulin antibody as loading control. Results are expressed as percentage with respect to the control. Untreated cells (black bars) and L-BMAA treated cells (grey bars). Results are representative of three independent experiments. \* Statistically significant difference from the corresponding control value ( $p \leq 0.05$ ).





**Fig. 3.** Representative Western blots of SH-SY5Y neuroblastoma cell extracts in the absence (c) and in the presence 10 mM L-BMAA for 24 hr. (A) Analysis of different species of TDP-43, including bands of low molecular weight truncated fragments of TDP-43 (+) and bands of high molecular species of TDP-43 (++). (B) Ubiquitinated proteins corresponding to the same gel. (C) Levels of pS (409/410) TDP-43 corresponding to the same gel. (D) Blot with anti  $\alpha$ -tubulin antibody as loading control. Results are representative of three independent experiments. (E) Quantitative analysis of TDP-43, high molecular forms of TDP-43, fragmented TDP-43, P-S (409/410)-TDP-43 and ubiquitinated proteins is shown. Results are expressed as a percentage with respect to the control. \* Statistically significant difference from the corresponding control value ( $p \leq 0.05$ ).

ronal death supports the theory that this aminoacid may serve as the etiologic agent for ALS/PDC syndrome.

Results obtained in this study indicate that L-BMAA causes neuronal death as observed by cellular viability evaluation. In the present study, the high concentra-

tion required inducing cell death may be due to immortalized cells undergo cell division, which could compensate for cell death. In this sense, high L-BMAA concentrations have been used by other authors in similar studies by using human neuroblastoma (Okle *et al.*, 2013; Lee and

McGeer, 2012).

Taking into account the changes observed in both GSK3 and TDP-43 in some neurodegenerative processes, we have investigated whether treatment with the neurotoxic amino acid evokes alterations in both proteins, in experimental conditions where L-BMAA causes cell death. We have found an increase in nuclear GSK3 $\beta$  without a cytosol decrease. In this regard, we must point out that insults, that induce cell death can cause accumulation of GSK3 $\beta$  in the nucleus prior to the activation of the caspase cascade (Bijur and Jope, 2001). In addition, it has been described an increased level of GSK3 $\beta$  expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (Yang *et al.*, 2008). This enzyme is involved in normal and pathological tau phosphorylation (Balaraman *et al.*, 2006) and it can play a role in AD pathogenesis (Kremer *et al.*, 2011).

On the other hand, GSK3 $\beta$  has been established as an antiapoptotic regulator of death receptor-induced extrinsic apoptosis, but this protective action occurs when GSK3 $\beta$  is located in the cytosol (Beurel and Jope, 2006). Under basal conditions, GSK3 $\beta$  is mostly cytosolic and associated with multiprotein complexes, which are their substrates (Meares and Jope, 2007). After stimulation, GSK3 $\beta$  is released from protein anchors and is translocated to nucleus, where produces cell death (Bijur and Jope, 2001). Moreover, it has been implicated in important cellular functions achieved by GSK3 phosphorylation of numerous transcription factors (Sakamaki *et al.*, 2012). The results described herein indicate that the toxicity of L-BMAA would imply an increase of the synthesis of GSK3 $\beta$  and a slight decrease of the inactive form of the enzyme. Therefore in response to L-BMAA treatment, GSK3 $\beta$  is possibly translocated to the nucleus, contributing to the process of cell death. With regard to the increase of nuclear GSK3 $\alpha$  reported herein, it has been described that an accumulation of nuclear GSK3 $\alpha$  mediates some neurological disorders including AD (Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2011). Therefore, it is tentative to speculate that GSK3 $\alpha$  plays a role in the cellular death caused by L-BMAA treatment.

On the other hand, we must point out that TDP-43 plays an important role in the pathogenesis of motor neuron diseases and frontotemporal lobar degeneration. This protein is a major component of the characteristic ubiquitinated neuronal inclusions, which are hallmarks of these pathologies (Lee *et al.*, 2011). The appearance of aberrant forms of TDP-43 has been associated with mutations in this protein (Liu-Yesucevitz *et al.*, 2010). In the past few years, it has been reported that L-BMAA is bound into proteins, due to it can be bound to serine transfer RNA

and become part of the protein chain. This misincorporation of wrong proteinogenic aminoacid L-BMAA can lead to alterations in protein structures performing misfolded proteins in genetically susceptible individuals. In addition, neurons are extremely sensitive to misfolded proteins, possibly because these potentially toxic species cannot be diluted out of cell (Cox, 2009; Dunlop and Rodgers, 2011; Rodgers and Dunlop, 2011). It is noteworthy that Pablo *et al.*, (2009) have confirmed that protein-bound L-BMAA is present in the brains of patients with AD and ALS. Furthermore, the roles of environmental exposure and genetic predisposition in producing these diseases-related accumulation of L-BMAA have been reported (Vance *et al.*, 2010).

Our experiments indicate that neuroblastoma cells treated with L-BMAA present an increase in aberrant forms of TDP-43, similar to those found in the pathological TDP-43 aggregates, appearing in some neurodegenerative diseases. Therefore, it is tentative to speculate that these TDP-43 misfolded proteins could form aggregates related with neuronal injury. In addition, TDP-43 and other misfolded proteins could be ubiquitinated as a normal biological response to an aberrant protein modification.

In conclusion, this study demonstrates that L-BMAA produces cell death in human neuroblastoma and evokes alterations in GSK3 $\beta$  and TDP-43, two possible biomarkers of neurodegenerative diseases.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratefulness to Dr R.E. Catalan for critical reading of the manuscript and constant support for this study. The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. (1988): Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589-601.
- Azoulay-Alfaguter, I., Yaffe, Y., Licht-Murava, A., Urbanska, M., Jaworski, J., Pietrokovski, S., Hirschberg, K. and Eldar-Finkelman, H. (2011): Distinct molecular regulation of glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  isozyme controlled by its N-terminal region: functional role in calcium/calpain signaling. *J. Biol. Chem.*, **286**, 13470-13480.
- Balaraman, Y., Limaye, A.R., Levey, A.I. and Srinivasan, S. (2006): Glycogen synthase kinase 3  $\beta$  and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1226-1235.
- Beurel, E. and Jope, R.S. (2006): The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.*, **79**, 173-189.

- Bijur, G.N. and Jope, R.S. (2001): Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta. *J. Biol. Chem.*, **276**, 37436-42.
- Brettschneider, J., Van Deerlin, V.M., Robinson, J.L., Kwong, L., Lee, E.B., Ali, Y.O., Safren, N., Monteiro, M.J., Toledo, J.B., Elman, L., McCluskey, L., Irwin, D.J., Grossman, M., Molina-Porcel, L., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2012): Pattern of ubiquilin pathology in ALS and FTL indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.*, **123**, 825-839.
- Calcerrada, M.C., Miguel, B.G., Martín, L., Catalán, R.E. and Martínez, A.M. (2002): Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in nuclear translocation of protein kinase C  $\zeta$  induced by C2-ceramide in rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, **514**, 361-365.
- Chiu, A.S., Gehring, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H. and Neilan, B.A. (2012): Excitotoxic potential of the cyanotoxin  $\beta$ -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol.*, **60**, 1159-65.
- Chung, Y.H., Joo, K.M., Kim, D.J., Kim, K.Y., Lee, W.B. and Cha, C.I. (2008): Immunohistochemical study on the distribution of glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice. *Neurol. Res.*, **30**, 926-931.
- Cox, P.A. (2009): Conclusion to the Symposium: the seven pillars of the cyanobacteria/BMAA hypothesis. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **10**, 124-126.
- Dunlop, R. and Rodgers, K. (2011): Proteins containing BMAA form autofluorescent aggregates and induce cell death. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **12 Suppl. 1**, 156.
- Holtkamp, W. (2012): The emerging science of BMAA. *Environmental Health Perspect.*, **120**, A110-A116.
- Karamyan, V.T. and Speth, R.C. (2008): Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.*, **82**, 233-246.
- Kremer, A., Louis, J.V., Jaworski, T. and Van Leuven, F. (2011): GSK3 and Alzheimer's Disease: Facts and Fiction. *Front. Mol. Neurosci.*, **4**, 17-24.
- Lee, M. and McGeer, P.L. (2012): Weak BMAA toxicity compares with that of the dietary supplement beta-alanine. *Neurobiol. Aging*, **33**, 1440-1447.
- Lee, V.M., Lee, V.M.Y. and Trojanowski, J.Q. (2011): Gains or losses: molecular mechanisms of TDP-43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 38-50.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderwyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L. and Wolozin, B. (2010): Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS One*, **5**, e13250.
- Meares, G.P. and Jope, R.S. (2007): Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19989-17001.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U. and Dietrich, D.R. (2013): L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low non excitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.*, **131**, 217-224.
- Pablo, J., Banack, S.A., Cox, P.A., Johnson, T.E., Papapetropoulos, S., Bradley, W.G., Buck, A. and Mash D.C. (2009): Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, **120**, 216-225.
- Rodgers, K. and Dunlop, R. (2011): The cyanobacteria-derived BMAA can be incorporated into cell proteins and could thus be an environmental trigger for ALS and other neurological diseases associated with protein misfolding. *Amyotroph. Lateral Scler.*, **12 Suppl. 1**, 22.
- Ross, S.M., Seelig, M. and Spencer, P.S. (1987): Specific antagonism of excitotoxic action of "uncommon" amino acids assayed in organotypic mouse cortical cultures. *Brain Res.*, **425**, 120-127.
- Sakamaki, J., Daitoku, H., Kaneko, Y., Hagiwara, A. and Fukamizu, A. (2012): GSK3 $\beta$  regulates gluconeogenic gene expression through HNF4 $\alpha$  and FOXO1. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **32**, 96-101.
- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A. and Arias, C. (2011): GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity and neurodegeneration. *Int. J. Alzheimer Dis.*, **2011**, 189728.
- Sutherland, C., Leighton, I.A. and Cohen, P. (1993): Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.*, **296**, 15-19.
- Vance, J.M., Ali, S., Bradley, W.G., Singer, C. and Di Monte, D. (2010): Gene-environment interactions in Parkinson's disease and other forms of parkinsonism. *Neurotoxicology*, **31**, 598-602.
- Xie, H., Hu, L. and Li, G. (2010): SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.*, **123**, 1086-1092.
- Yamamoto, A. and Simonsen, A. (2011): The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for autophagy in neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.*, **43**, 17-28.
- Yang, W., Leysstra-Lantz, C. and Strong, M.J. (2008): Upregulation of GSK3  $\beta$  expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res.*, **1196**, 131-139.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap)

## $\beta$ -N-methylamino-L-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS

Estefanía de Munck<sup>a</sup>, Emma Muñoz-Sáez<sup>a</sup>, Begoña G. Miguel<sup>b</sup>, M. Teresa Solas<sup>c</sup>, Irene Ojeda<sup>a</sup>, Ana Martínez<sup>d</sup>, Carmen Gil<sup>d</sup>, Rosa M<sup>a</sup> Arahuetes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología Celular, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Química Médica – Centro Superior de Investigaciones Científicas, 28006 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 December 2012

Received in revised form

3 April 2013

Accepted 10 April 2013

Available online 25 April 2013

#### Keywords:

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine

Lumbar spinal cord

Motor cortex

Rat sporadic Amyotrophic Lateral

Sclerosis model

### ABSTRACT

$\beta$ -N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a neurotoxic amino acid that has been related to various neurodegenerative diseases. The aim of this work was to analyze the biotoxicity produced by L-BMAA *in vivo* in rats, trying to elucidate its physiopathological mechanisms and to search for analogies between the found effects and pathologies like Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). Our data demonstrated that the neurotoxic effects *in vivo* were dosage-dependent. For evaluating the state of the animals, a neurological evaluation scale was developed as well as a set of functional tests. Ultrastructural cell analysis of spinal motoneurons has revealed alterations both in endoplasmic reticulum and mitochondria. Since GSK3 $\beta$  could play a role in some neuropathological processes, we analyzed the alterations occurring in GSK3 $\beta$  levels in L-BMAA treated rats, we have observed an increase in the active form of GSK3 $\beta$  levels in lumbar spinal cord and motor cerebral cortex. On the other hand, (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43) increased in L-BMAA treated animals. Our results indicated that N-acetylaspartate (NAA) declined in animals treated with L-BMAA, and the ratio of N-acetylaspartate/choline (NAA/Cho), N-acetylaspartate/creatine (NAA/Cr) and N-acetylaspartate/choline + creatine (NAA/Cho + Cr) tended to decrease in lumbar spinal cord and motor cortex. This project offers some encouraging results that could help establishing the progress in the development of an animal model of sporadic ALS and L-BMAA could be a useful tool for this purpose.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:** ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis; ALS-PDC, Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson-Dementia complex; Cho, choline; Cr, creatine; ER, endoplasmic reticulum; GSK3 $\beta$ , glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ; NAA, N-acetylaspartate; L-BMAA,  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine; TDP-43, (TAR)-DNA-binding protein 43.

\* Corresponding author at: Departamento de Biología Animal II, Universidad Complutense de Madrid, C/José Antonio Nováis N° 2, 28040, Madrid, Spain. Tel.: +34 913944987; fax: +34 913944935.

E-mail address: [rporterio@bio.ucm.es](mailto:rporterio@bio.ucm.es) (R.M. Arahuetes).

1382-6689/\$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.04.007>

## 1. Introduction

L-BMAA is a highly neurotoxic, non-protein and non-lipophilic amino acid, which is produced by most cyanobacteria (Cox et al., 2005; Banack et al., 2007). Cyanobacteria are widespread organisms that can exist either as free-living organisms or forming symbiotic associations in both aquatic and terrestrial environments (Esterhuizen and Downing, 2008; Metcalf et al., 2008). The presence of L-BMAA in mollusks and fish used for human consumption suggests that L-BMAA may bioaccumulate in aquatic food chains (Brand et al., 2010; Jonasson et al., 2010; Mondo et al., 2012). The detection of L-BMAA in seafood stresses the importance of evaluating the magnitude of human exposure to this neurotoxin.

During the last few years, L-BMAA has become relevant since it has been related with several neurodegenerative diseases. The first indication about this relation was shown by Spencer et al. (2010), who pointed to a relation between this amino acid and Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinson-Dementia Complex (ALS-PDC) in the Isle of Guam. Duncan et al. (1990) argued that massive amounts of flour would have to be consumed to generate a progressive neurological disease among the Chamorro people. Biomagnification (the increasing accumulation of bioactive, often deleterious molecules through successively higher trophic levels of a food chain) has been proposed by Cox and Sacks (2002) as a mechanism that could generate sufficiently high doses of cycad neurotoxins to produce neurological disease among the Chamorro people.

Other reports have found L-BMAA in brain tissue of patients with sporadic Alzheimer's disease in Canada (Murch et al., 2004). Furthermore, other subpopulations have been found to have a higher prevalence of ALS compared to normal population, namely: some groups of sportsmen, such as Italian football players (Chiò et al., 2005) and American football players (Abel, 2007); and Gulf War Veterans who stayed in Qatar desert (Cox et al., 2009). The common factor of all these events seems to be the exposure to environmental toxins present in football pitches and desert dust, where both cyanobacteria and L-BMAA have been found (Cox et al., 2005; Papapetropoulos, 2007; Bradley and Cox, 2009). Caller et al. (2012) reviewed the literature on important studies of spatial clustering of ALS and explore the hypothesized link between the neurotoxin L-BMAA and ALS. Goto et al. (2012) suggested that chronic exposure of small doses of L-BMAA by ingestion might represent at least one factor in the induction of neurodegenerative diseases such as ALS, Parkinson Disease or Alzheimer Disease.

In the presence of bicarbonate, L-BMAA generates a carbamylated adduct (Myers and Nelson, 1990) similar to glutamate, an excitatory amino acid involved in the pathogenesis of ALS.  $\beta$ -Carbamate form of L-BMAA increases intracellular calcium in a concentration-dependent way, which suggests that L-BMAA may play a role in excitotoxic neurodegeneration (Papapetropoulos, 2007).

Smith et al. (1992) reported that L-BMAA is likely transported by the neutral amino acid transporter of the adult blood brain barrier (BBB). L-BMAA is a mixed agonist for excitatory amino acid receptors. It has a low affinity for NMDA

receptors, which is only noticeable in the presence of bicarbonate, however it can activate metabotropic subtypes of receptors more powerfully (Brownson et al., 2002; Cucchiaroni et al., 2010).

Hence, three aspects of the mechanism by which L-BMAA exerts neurotoxicity are proposed: (1) direct activation of NMDA receptors, (2) activation of glutamate metabotropic receptors (mGluR5 and mGluR1) and (3) oxidative stress induction. L-BMAA inhibits cystine/glutamate exchange transporter (Xc-System), which mediates cystine absorption; as a consequence there is a loss of glutathione and oxidative stress increases. Moreover, this toxin appears to release glutamate via the Xc-System (Liu et al., 2009).

As described above, it has been hypothesized that L-BMAA can elicit ALS-PDC. Despite this fact, the hypothesis is still controversial, since intoxication assays with L-BMAA in animals have yielded uneven results (Karamyan and Speth, 2008). These results have been criticized because of the extraordinary variety they present about dose-effect correlation, difficult to extrapolate to the progression rate found in populations with neurodegenerative pathologies.

L-BMAA has been suggested to induce oxidative stress, to alter protein function through incorporation into proteins, and to induce neuronal degeneration via overactivation of glutamate receptors (Lobner et al., 2007; Murch et al., 2004). L-BMAA has also been reported to affect neurite outgrowth and neurofilament protein levels at low concentrations (Abdulla and Campbell, 1993).

There is evidence suggesting that mitochondria may be involved in cascades that take place in neurodegenerative diseases (Lezi and Swerdlow, 2012). In addition, recent data indicates that endoplasmic reticulum (ER) stress plays a central role in ALS pathogenesis (Walker and Atkin, 2011).

Recent findings have demonstrated that glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) can play an important role in several neurodegenerative disorders. Modulation of GSK3 $\beta$  in brain areas devoted to cognitive function has become a major focus for treating neuropsychiatric and neurodegenerative diseases (Salcedo-Tello et al., 2011).

On the other hand, some degenerative diseases are likely associated with pathological aggregates of (TAR)-DNA-binding protein 43 (TDP-43). Under normal conditions, this protein is primarily located in the nucleus, whereas there are only small amounts in the cytosol (Winton et al., 2008; Brettschneider et al., 2012). It has been found that TDP-43 has a critical role in diverse neurodegenerative diseases, being a major component of Tau negative and ubiquitin-positive inclusions that characterize ALS (Lee et al., 2011).

Given this background, we did an exhaustive analysis on the dosage that should be administered in experimental animals and the subsequent effects, trying to search analogy between the effects found and pathologies like ALS. Currently, there is an animal model for familiar ALS (which represents only 5–10% of the cases of ALS), consisting of mutant mice for superoxide dismutase 1 (SOD1) (Gurney, 1994; Nagai et al., 2001). However, there is no model available for sporadic ALS research so that it would be interesting to establish it. Therefore with this paper we did the first step towards an experimental model for sporadic ALS and L-BMAA could be a valid tool for this purpose.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Animals

The assays were accomplished using male rats, *Rattus norvegicus*, albinus variety, Wistar strain (Harlan Laboratories), which were kept in standard housing conditions (a regimen of 12 h light and 12 h darkness, with food and water *ad libitum*). The protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Complutense University of Madrid.

### 2.2. L-BMAA treatment

The way to administer L-BMAA was fixed to achieve a treatment to be the least aggressive for the animal and the easiest to reproduce. Therefore, intravenous and intraventricular injections were directly discarded, so we choose the intraperitoneal injection. Several data in the literature confirm neurological deficits in rats by intraperitoneal (Polsky et al., 1972; Seawright et al., 1990) L-BMAA administration.

In order to preserve the normal development of the nervous system, we do not begin treatment before weaning, postnatal

day 21 (weighting about 50 g). Doses administered to groups were from 100 to 350 mg/kg daily during 5 consecutive days. L-BMAA was dissolved in PBS (only vehicle in controls). The number of rats by group was never less than 10. In our study we used lower doses than authors mentioned above given that we hope to obtain chronic neurological damage.

After treatment, a set of functional and neurological evaluation tests were performed to check progression rate of treated individuals.

### 2.3. Weight progression control

To analyze the effect of L-BMAA on the normal development of these animals during and after treatment, we observed periodically the weight of the rats.

### 2.4. Neurological evaluation

The neurological evaluation has been established in a scale comprised between 0 and 10, where 0 is the evaluation given to animals which are not symptomatic, control animals, and 10 belongs to a state of total functional loss of the hindlimbs and postural control (Table 1). The evaluation is done by means of

**Table 1 – Neurological evaluation scale.**

	Ambulation	Tail lift test	Strength test
0	Animals lean the whole sole of their hindlimbs when walking at a normal speed	Hindlimbs positioned describing a T and/or coordinated kicking.	Hindlimbs keep under the body or very close to it. They respond to the pull stimulus in the opposite direction (resistance response) from the tail
1–2		Animals tend to climb to their tail pivoting laterally from the principal axis of the body	
3		Progressive loss of the T position	
4	Animals do not lean the whole sole of their hindlimbs, they walk on tiptoe	Animals cannot describe a T with their hindlimbs. Uncoordinated kicking	
5		Animals stretch the hindlimbs backwards (caudal position)	When pulled from the tail, animals tend to split their hindlimbs away from the body and loose progressively their resistance response
6	When animals turn around, hindlimbs remain under the body (slower position correction)	Uncoordinated kicking	
7	Bad position, animals start to walk lateralwards	When hindlimbs are relaxed they remain very close together and prone to the anterior part of the body	Absence of resistance response (due to a lack of strength). Hindlimbs split away from the body
8	Hindlimbs do not respond correctly while walking (e.g. they slip)	Animals tend to grasp their hindlimbs together and try to climb to their tail pivoting frontally from the principal axis of the body	Hindlimbs markedly split away from the body
9	Loss of coordination when walking. Animals walk appreciably lateralwards		Abnormal back curvature during the test. Animals move laterally and have very few strength in their hindlimbs
10	Total loss of motor control of the hindlimbs Muscles spasm, whole body shakes		Total absence of hindlimbs strength

a blind study in which researchers do not know which animal is being observed. Animals injected with the vehicle showed no alteration in the neurological evaluation and, therefore, would be represented in the abscissa; for this reason this graphical representation has been omitted. The progression of both treated and control animals were observed weekly from the end of treatment until sacrifice.

The assessment of the neurological state is determined using three approaches implemented periodically: ambulation observation, the tail suspension test and the strength test. The three approaches of the assessment had not an equal contribution to the final neurological evaluation. Among the three parts of the neurological evaluation, the most important test was the tail suspension, which represents 70% of the total assessment, and the other two tests were used to fine-tune the details of the value with an importance of 15% each.

#### 2.4.1. Ambulation

We observed both postural control and the way the hind limbs were leant during motion. This test was carried out introducing the rat inside a  $20 \times 20 \times 100$  cm corridor.

#### 2.4.2. Hind-foot reflex test

The rat was suspended by the tail 10 cm over the surface. We evaluated the ability to keep the hind limbs in the normal neutral position adopted by rodents in such situation, i.e. describing a “T”. The stiffness of the limbs and the inter-limb coordination during kicking were evaluated as well.

#### 2.4.3. Strength test

The rats were set down on a flat surface, both forelegs and hindlimbs on it. Then, the tail was pulled softly to the opposite direction the animal moves. We observed the ability the rats had to drag and offer resistance, assessing their faculty to kept hindlimbs under the body without them spreading their legs away from it.

### 2.5. Functional assessments

In order to check if muscles were functional and how motor control evolves, a battery of tests was added as the different groups were treated with L-BMAA. Eventually, our aim was finding the most suitable tests to check the global condition of the animals. These trials let us analyze balance reflexes and motor coordination of the individuals, two different measurements were taken:

#### 2.5.1. RotaRod

Two different RotaRod tests were implemented periodically one month after the treatment was finished.

1. The animal was placed on the RotaRod at a constant speed of 15 rpm for a maximum time of 10 min. The time the rats could stay on the axle was measured.
2. Maximum speed the animal could bear on the rod when this revs up from 4 to 40 rpm in 30 s.

#### 2.5.2. Footprints

The hindlimbs were drenched with ink and the animal was hold by its back with both hands carefully, in such manner

that the body was parallel to the landing surface. Then, the animal was released from a height of 30 cm; afterwards, the distance between the footprints drawn on the surface when the rat falls was measured (Aoki et al., 2011).

The neurological evaluation and functional assessments was carried out to 10 animals for each treatment group. To verify the motor neurons state, tests described below were carried out with animals that had a neurological evaluation value not less than 7, which correspond to 80–100 days post-treatment animals with L-BMAA treatment of 300 mg/kg/day ( $n=30$  treated animals). We sacrificed between 3 and 5 control animals and treated ones of this group for each analysis, so we made 3–5 replicates and 3 pseudo-replicates. Control and treated animals were sacrificed for each assay: electron microscopy (EM), immunohistochemistry, high resolution magic angle spinning (HR-MAS), GSK3 $\beta$ , and TDP-43.

### 2.6. Electron microscopy

The most affected animals were sacrificed three months after treatment under general anaesthesia (ketamine/xylazine mixture; ketamine 100 mg/ml, xylazine 2%). Subsequently they underwent a perfusion with a fixative solution which contains paraformaldehyde 4% and glutaraldehyde 2.5% in a phosphate buffer 0.1 M and pH 7.3. Some fragments of the lumbar spinal cord were extracted and immediately submerged in the same fixative solution at 4 °C for 4 h. Then, the tissue was postfixed for 1 h in a 1:1 solution of osmium tetroxide 2% and aqueous potassium ferrocyanide 3%. The samples were next dehydrated in seriated solutions of acetone and eventually embedded in Spurr's resin. The ultrathin slices were stained with Reynold's lead citrate. The electron micrographs were obtained at 80 kV with an electron microscope JEOL 1010 equipped with a “Megaview” camera.

### 2.7. Immunohistochemistry

Ultrathin slices were fixed in 0.1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h at 4 °C. After washing in PBS, samples were dehydrated in successive ethanol solutions with progressive lowering of temperature to 30 °C and then embedded in Lowicryl K4M (PolyScience, Inc., Washington, USA) at 30 °C. The K4M resin was polymerized under UV light for 24 h at 30 °C and for 48 h at room temperature. Low-temperature dehydration, embedding, and polymerization were performed with an automatic freeze substitution system (Leica, Vienna, Austria). Ultrathin sections (70 nm) were obtained with an ultramicrotome (Ultracut E, Reichert-Jung, Vienna, Austria) and cocarrying ultrathin sections were sequentially floated in 0.1 M glycine in PBS and 5% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Grids were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-caspase 3 diluted 1:200 with PBS containing 1% BSA. After washing with PBS, the sections were incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody; goat anti-rabbit IgG (80 ng/ml) conjugated to 15-nm gold particles (British Biocell, Cardiff, UK) diluted 1:200 in PBS. After PBS and water washings, sections were stained with 2% uranyl acetate (20 min) and Reynold's lead citrate (3 min) and examined with a JEOL 1010 transmission electron



microscope. Controls were included by excluding the primary antibody.

## 2.8. Magnetic resonance spectroscopic experiments

Intact cerebral/spinal cord tissue was examined using high resolution magic angle spinning (HR-MAS) operating at 4 °C to minimize tissue degradation, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy was performed at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer 11.7 T. These samples were placed within a 50 µl zirconium oxide rotor with cylindrical insert and spun at 4000 Hz spinning rate, to remove the effects of spinning side bands from the spectra acquired. Shimming and NMR preparation time was tried to keep to a minimum, but throughout this the NMR analysis was chilled to 4 °C to minimize metabolic changes. Under such conditions no noticeable degradation was observed during acquisition.

Standard solvent suppressed spectra were acquired into 16 k data points, averaged over 256 acquisitions, total acquisition 14 min using a sequence based on the first increment of the NOESY pulse sequence to effect suppression of the water resonance and limit the effect of B<sub>0</sub> and B<sub>1</sub> inhomogeneities in the spectra (relaxation delay–90°–t<sub>1</sub>–90°–t<sub>m</sub>–90°–acquire free induction decay (FID)) in which a secondary radio frequency irradiation field is applied at the water resonance frequency during the relaxation delay of 2 s and during the mixing period (t<sub>m</sub> = 150 ms), with t<sub>1</sub> fixed at 3 µs. A spectral width of 8333.33 Hz was used. All spectra were processed using TOPSPIN software, version 1.3 (Bruker Rheinstetten, Germany). Prior to Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz. Spectra were phased, baseline-corrected and referenced to the sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate singlet at δ 0 ppm.

## 2.9. Analysis of GSK3β

Sections of frozen Lumbar spinal cords and motor cerebral cortex (150 mg) were homogenized in lysis buffer (1% Nonidet P-40, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5), including EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) followed by centrifugation at 800 × g for 15 min. Protein concentrations of all samples were determined by Bradford assay (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis MO, USA). Protein (150 µg) from these supernatants were resolved by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore Corp.). Membranes were incubated with rabbit anti-GSK3β (Thermo Scientific) at 4 °C overnight or with rabbit anti P-(Ser9)-anti-GSK3β (Signalway Antibody). Following washing, blots were then incubated with HRP-conjugated secondary antibody and the proteins were detected by enhanced chemiluminescence.

## 2.10. Analysis of TDP-43

Frozen tissues from motor cortex of control and L-BMAA treated animals were used for the sequential extraction of proteins with buffers of increasing stringency, as described (Liu-Yesuievitz et al., 2010). Briefly, motor cortex was extracted at 5 ml/g (v/w) with low salt buffer (10 mmol/l

**Table 2 – Metabolite percentage decrease respect to control animals, obtained by means of 1H-MRS in lumbar spinal and motor cortex. Data are presented as mean ± SD.**

	Lumbar spinal cord	Motor cortex
NAA	13 ± 1.2%*	30 ± 2.9%**
NAA/Cr	17 ± 1.8%*	6 ± 2.0%
NAA/Cho	13 ± 1.0%*	30 ± 2.5%**
NAA/Cr + Cho	16 ± 1.3%*	15 ± 1.4%*
* p < 0.05.		
** p < 0.02.		

Tris, pH 7.5, 5 mmol/l EDTA, 1 mmol/l dithiothreitol, 10% sucrose, and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), high salt-Triton X-100 buffer (low salt buffer + 1% Triton X-100 + 0.5 mol/l NaCl), myelin flotation buffer (Triton X buffer containing 30% sucrose), and sarkosyl buffer (low salt buffer + 1% N-lauroyl-sarcosine + 0.5 mol/l NaCl). The detergent-insoluble materials were extracted in 0.25 ml/g of urea buffer (7 mol/l urea, 2 mol/l thiourea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 30 mmol/l Tris, pH 8.5). Protein concentrations of all samples were determined by Bradford assay (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). For Western blot analysis, fractions (100 µg of proteins) were analyzed by using gradient PAGE on a 4–16% in a Tris-glycine gel and probed with anti-TDP43 (Protein Tech) and secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG, Calbiochem). Digital images were acquired using a Fujifilm Intelligent Darkbox II (Fuji Systems USA, Stamford, CT).

## 2.11. Statistical analysis

The gathered results underwent a statistical analysis performed by GraphPad Prism 4. Data were adjusted to the most suitable regression model: weight by Boltzmann regression and both neurological evaluation and RotaRod by linear regression. The results yielded by footprint test were analyzed through a Friedman's test. Factors represented in Table 2 were analyzed using an F-test. p-Value was considered significant when p ≤ 0.05.

## 3. Results

### 3.1. L-BMAA treatment did not produce changes in the weight

The weight of the animals treated with L-BMAA did not vary significantly respect to controls in any case (Fig. 1).

### 3.2. L-BMAA treatment induced dosage-dependent neurological damage

Neurological damage of treated animals, with L-BMAA doses comprised between 100 mg/kg/day and 350 mg/kg/day, was shown in Fig. 2. The lower doses produced milder neurological damage that appeared later compared to other doses. Lineal regression analysis showed no differences between the treatments (200–350 mg/kg/day) and so we concluded that in this

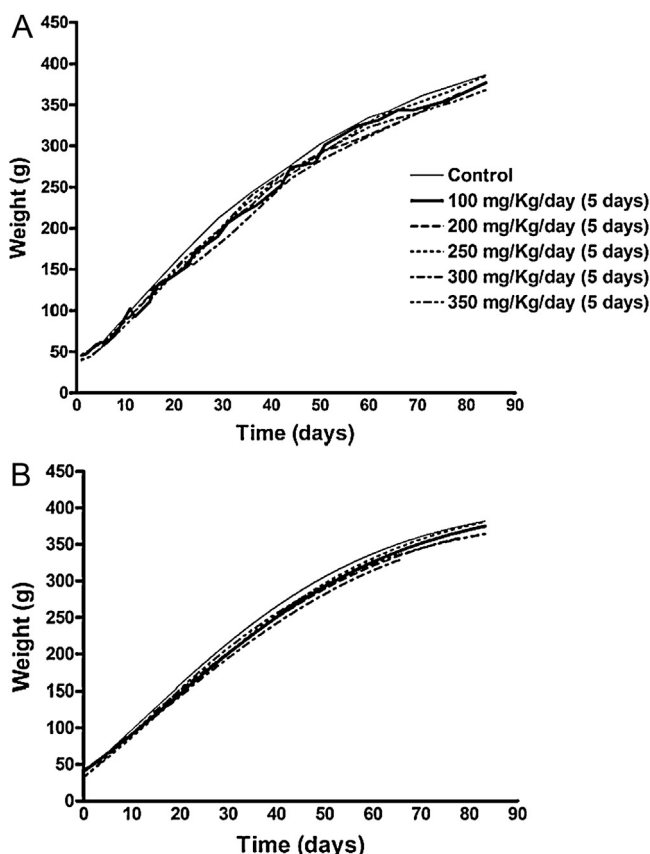


Fig. 1 – (A) Graphical representation of the weight evolution of control animals and L-BMAA treated animals from postnatal day 21. (B) Sigmoidal regression based on the Boltzmann equation showed that there are not significant differences between the curves. The number of animals per group is  $n \geq 10$ .

dosage interval a similar level of neurological damage was achieved.

The data corresponding to control animals did not shown in the graph (Fig. 2) because it overlaps with X-axis.

The results presented in this paper came from the group of animals treated with the dose of L-BMAA 300 mg/kg.

### 3.3. L-BMAA treatment caused neuromuscular alterations measured by means of functional assays as RotaRod test and footprint test

#### 3.3.1. RotaRod

The results obtained with both RotaRod tests were:

1. Constant speed of 15 rpm: the time that both treated rats stay on the device compared to their respective controls was shorter ( $p = 0.00043$ ) (Fig. 3A).
2. Acceleration mode: treated rats did not show significant differences with respect to controls (data not shown).

#### 3.3.2. Footprints

Fig. 3B shows that treated animals did not spread their legs away from the body during landing as much as control

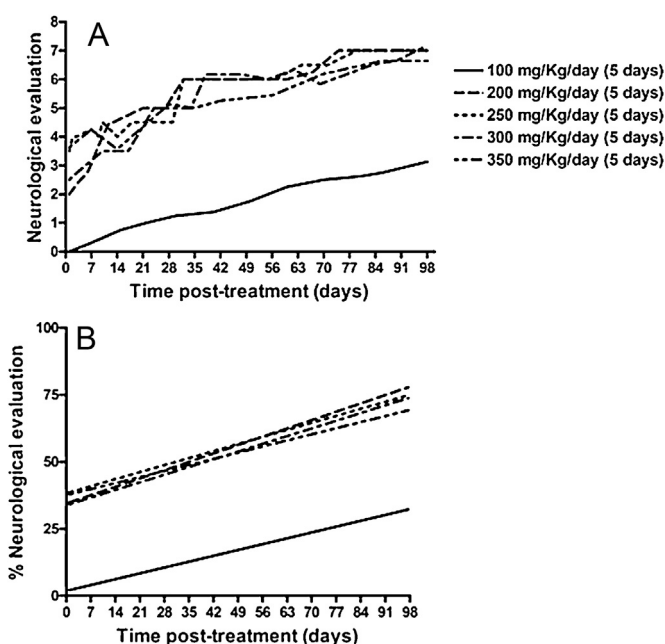


Fig. 2 – (A) Neurological evaluation carried out using the method described in Section 2.4. (B) Lineal regression showed no differences between the treatments (200–350 mg/kg/day). Comparing the 100 mg/kg/day with the rest of groups is highly significant in terms of elevation of the line:  $F = 99.9155$ ,  $p < 0.0001$ . The data corresponding to control animals did not show in the graph because it overlaps with X-axis.

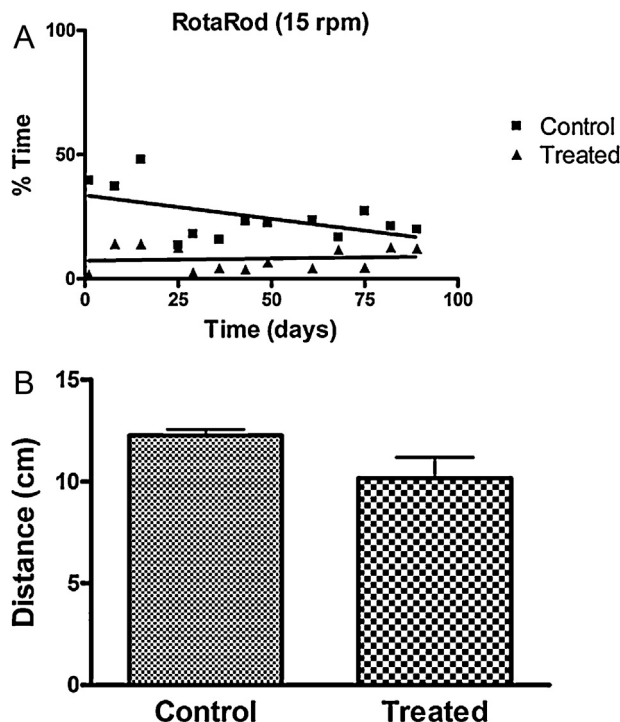


Fig. 3 – (A) RotaRod: constant speed of 15 rpm: linear regression showed that the time that treated rats stay on the device compared to their respective controls is shorter ( $p = 0.00043$ ). (B) Test of footprints: represents the distance (cm) between the hindlings in the landing.

animals did. Although these differences were not significant, we observed that treated animals exhibit much more stiffness in their hindlimbs, which could affect the position while cushioning the fall (Fig. 3B).

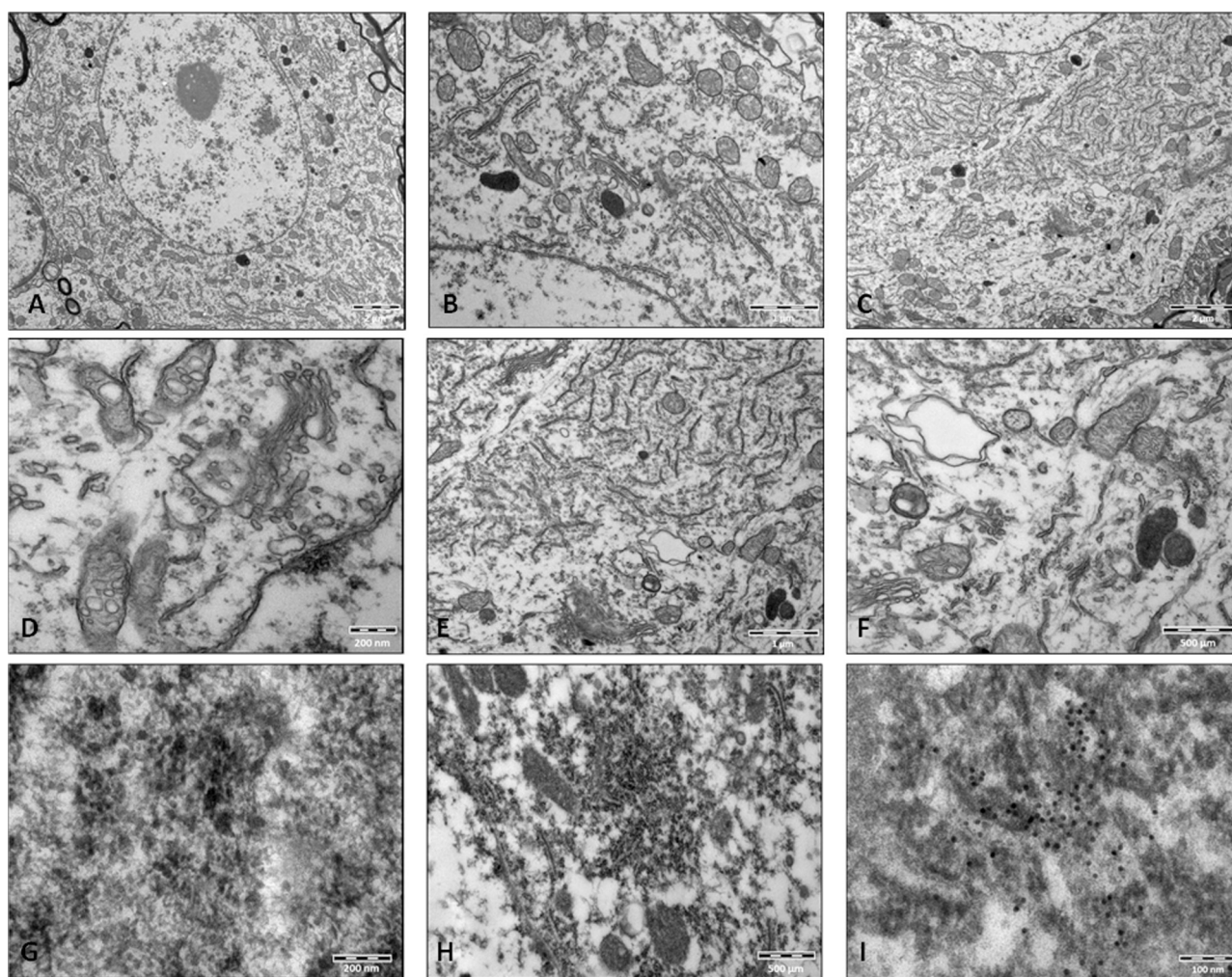
### 3.4. Electron microscopy indicated mitochondrial alterations, endoplasmic reticulum disorganization and abundant presence of caspase-3 in motor neurons of the lumbar spinal cord from L-BMAA treated animals

We could observe some singular features in the spinal motor neurons in the pictures obtained from the lumbar spinal cord samples of treated animals: (1) The endoplasmic reticulum looked disassembled, had short and disorganized cisternae (Fig. 5), although some small areas remained organized. Besides, ribosomes were dissociated from ER in an abnormally

high proportion, thence giving the cytoplasm a dotted appearance. (2) Mitochondria showed initial stages of vacuolization, that is to say, their cristae were swollen, and moreover some of them were totally degenerated. (3) Immunohistochemical analysis indicated an abundant presence of caspase-3 in the perinuclear area of spinal motor neurons (Fig. 4). On the other hand, we had found some oligodendrocytes undergoing a cell death process, with typically apoptotic nuclei (Fig. 5).

### 3.5. Magnetic resonance spectroscopy experiments indicated that L-BMAA treated animals have alterations in NAA and in the ratios of NAA/Cr, NAA/Cho and NAA/Cr + Cho

Although more than 30 metabolites can be distinguished in healthy brains by 1H-MRS, N-acetylaspartate (NAA), total



**Fig. 4 – Lumbar spinal cord images of electron microscopy.** A and B are images taken from control animals and the rest belong to rats with a neurological evaluation not less than 7. (A) (8 K, bar = 2  $\mu$ m) shows an overview of a motor neuron control. (B) (25 K, bar = 1  $\mu$ m) is a detail of A, showing the normal structure of the organelles (endoplasmic reticulum and mitochondria). (C) (12 K, bar = 2  $\mu$ m) is a panoramic view of a motor neuron belonging to a treated animal. (D) (25 K, bar = 200 nm), there are many mitochondria disorganized. (E) (25 K, bar = 1  $\mu$ m) there is fragmentation of the endoplasmic reticulum. (F) (50 K, bar = 500  $\mu$ m) image is a detail of degenerate mitochondria. (G)–(I) are images of immunohistochemistry, marking caspase-3. (G) (100 K, bar = 200 nm) correspond to motor neuron control. (H) (40 K, bar = 500  $\mu$ m) and (I) (200 K, bar = 100 nm) show caspase-3 in the perinuclear area of spinal motor neurons derived from animals treated with the amino acid.



creatine (Cr) and total choline (Cho) have been measured mostly due to their simple spectral patterns (singlet) and relatively high concentrations in the brain.

Both in spinal cord and cortex, NAA decreased  $13 \pm 1.2\%$  y  $30 \pm 2.9\%$ , respectively. NAA/Cr ratio decreased significantly in the spinal cord ( $17 \pm 1.8\%$ ) and scarcely in the cortex ( $6 \pm 2.0\%$ ). NAA/Cho ratio decreased  $13 \pm 1.0\%$  in the spinal cord and  $30 \pm 2.5\%$  in the cortex. Finally, NAA/Cr + Cho ratio decreased in both tissues in a similar way  $16 \pm 1.3\%$  y  $15 \pm 1.4\%$ .

### 3.6. GSK3 $\beta$ increased in lumbar spinal cord and motor cortex in L-BMAA treated rats

Since GSK3 $\beta$  could play a role in some neuropathological processes, we analyzed the alterations occurring in GSK3 $\beta$  levels in L-BMAA treated rats. Our results indicated an increase in total GSK3 $\beta$  levels in lumbar spinal cord and motor cerebral cortex. As shown in Fig. 6, the phosphorylated form of the enzyme also increased, but the difference between total GSK3 $\beta$  and P-(Ser 9) GSK3 $\beta$  was about 58% higher in the motor cortex of animals treated with L-BMAA (83331 Arb. Unit) than in the control animals (52757 Arb. Unit), indicating a net increase of GSK3 $\beta$  activity.

### 3.7. High molecular forms of TDP-43 were accumulated in lumbar spinal cord of L-BMAA treated rats

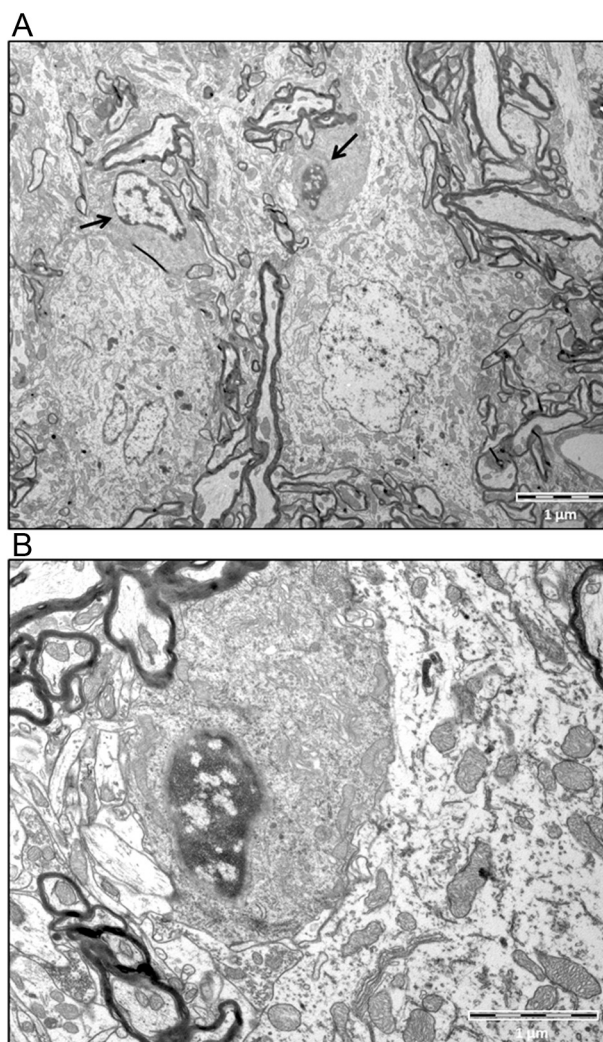
We have investigated whether the treatment with L-BMAA evokes alterations in TDP-43, trying to find common factors between the action of the neurotoxic amino acid and the effects found in the ALS. Urea extracts demonstrated a marked increase in the amount of specific anti-TDP-43 high molecular weight bands in motor cerebral cortex of L-BMAA treated rats (Fig. 7).

## 4. Discussion

Given the interest evoked by the L-BMAA in recent years, our research has focused on the analysis of the toxicity of this amino acid to correlate its toxic effects with similar symptoms to sporadic ALS.

*In vivo* experiments have demonstrated that L-BMAA can cause a number of motor dysfunctions if ingested (Spencer et al., 1987a,b; Perry et al., 1989; Cruz-Aguado et al., 2006), injected intraperitoneally (Polsky et al., 1972; Seawright et al., 1990), injected intraventricular (Rakoncay et al., 1991; Matsuoka et al., 1993; Chang et al., 1993) or injected intraes-trial (Santiago et al., 2006; Buenz and Howe, 2007). *In vitro* experiments showed that this toxin binds to glutamate receptors with deleterious results (Weiss and Choi, 1988; Brownson et al., 2002; Liu et al., 2009; Chiu et al., 2012).

Goto et al. (2012), offers the first demonstration by intracellular recording of the effect of ingested L-BMAA on the postsynaptic response of an identified glutamatergic cell in a living, undissected organism (*Drosophila melanogaster*), and correlates these observations with the specific motor dysfunctions that result from ingestion. Their results suggest that L-BMAA acts as a glutamate agonist, causing NMDA receptor channels to remain open for prolonged periods of time,

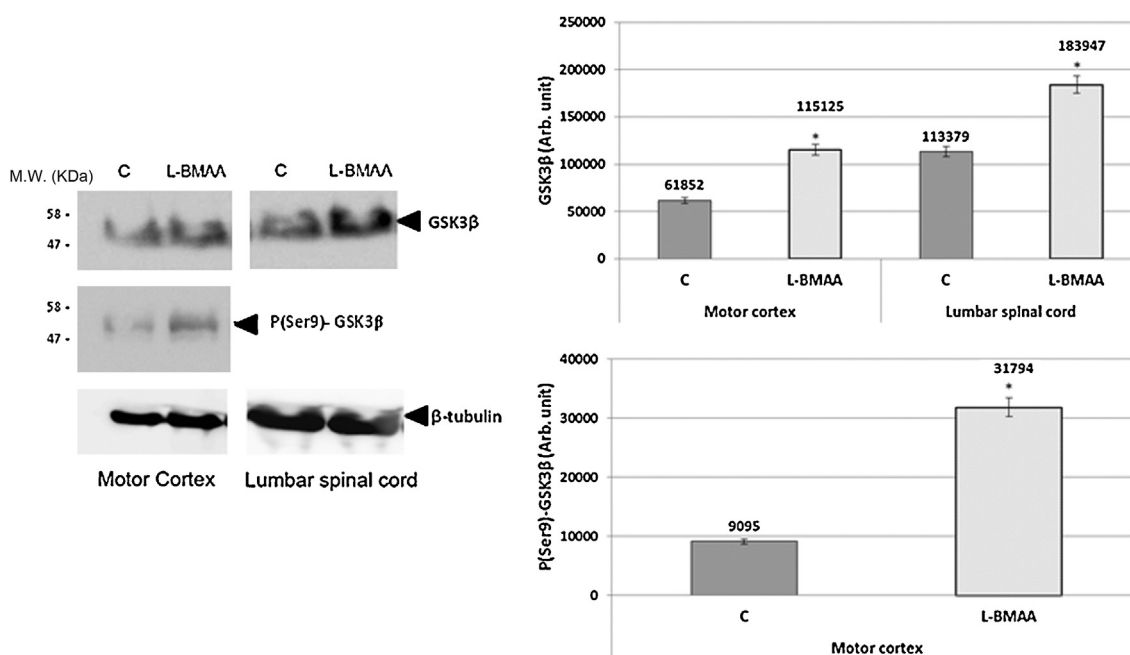


**Fig. 5 – (A) (4K, bar = 1  $\mu$ m) is an overview of spinal cord showing two oligodendrocytes indicated by arrows. (B) (15 K, bar = 1  $\mu$ m) shows an expanded detail of an oligodendrocyte with a typically apoptotic nucleus.**

thereby damaging the cell by excitotoxicity. The effect on the postsynaptic response became apparent days before the function of the postsynaptic cell (wing beat) became affected. Severely depolarized cells were able to fully recover with the removal of L-BMAA from the food source, suggesting that blocking L-BMAA binding in the brain might be a good treatment strategy.

First, we established the best age gap to start the treatment of the animals. An early treatment in newborn rats was discarded, because during the first 3 weeks after birth, rodents undergo the so called “brain growth spurt” (BGS), a stage characterized by rapid neurodevelopmental changes such as axonal and dendritic growth, establishment of neuronal connections, synaptogenesis and proliferation of glial cells followed by myelination (Davison and Dobbing, 1968). Karlsson et al. (2009a,b) have demonstrated that L-BMAA treatment of neonatal rats during the peak of BGS (PNDs 9–10) induced acute alterations such as impaired motor capacity and hyperactivity; this could be related with changes in the





**Fig. 6 – (A) Analysis of GSK3β and P(Ser 9)-GSK3β by Western Blot in motor cortex in animals control and treated with L-BMAA and analysis of GSK3β in spinal lumbar cord. (B) Protein bands were scanned and quantified using Multigaue Image software v3.0. The immunoblots were representative of one of three experiments with similar results. These results were quantified in arbitrary units and were represented in the attached graph as means ± S.E.M. (\**p*-value < 0.05).**

glutamatergic system. In fact, Karlsson et al. (2012) reported permanent effects of a low neonatal dose of L-BMAA in the adult hippocampus suggesting that L-BMAA could potentially disturb many processes during the development.

Thus, as described above, we decided carry out treatment outside the BGS stage, from day 21 post-natal, at weaning time.

Weight progression assessment of animals has shown that the treatment with L-BMAA at weaning time does not affect general development, which is in agreement with the results obtained by Karlsson et al. (2009a,b). These results allow us to discard the possibility that the treatment causes nutritional deficiency, since the weaning time is a key moment of the development and growth of animals.

In order to obtain a quick and chronic neurological impairment, our results show that the most effective dose is comprised between 200 and 350 mg/kg/day, injected daily for 5 consecutive days at weaning time, and we choose the 300 mg/kg dose of L-BMAA to carry out the study presented.

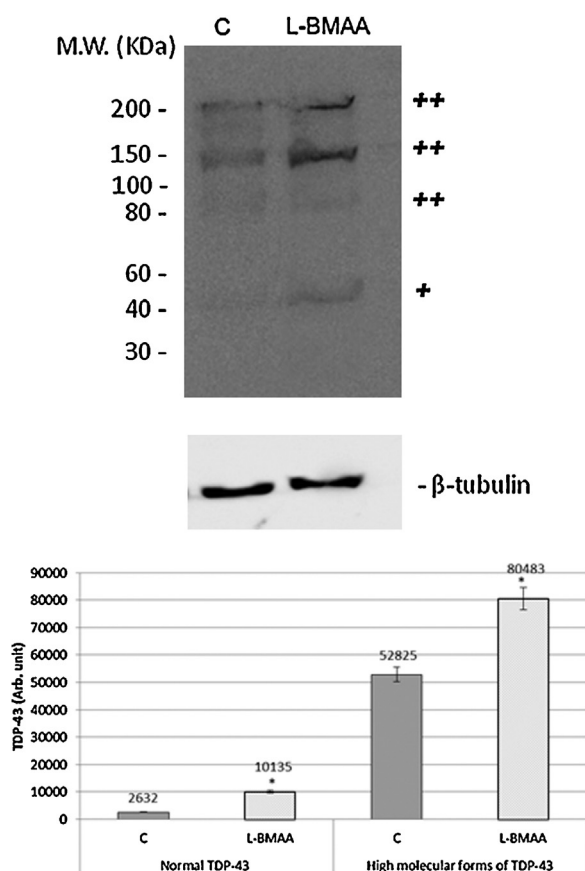
Glutamate receptors have distinct regional and temporal expression profiles, often with transient peak levels during the first neonatal weeks in rats. Most of the mRNA expression levels of NMDA receptor subunits are the highest during the same period (Monyer et al., 1994), suggesting that the high susceptibility towards L-BMAA during the neonatal period may be related to the peak expression of glutamate receptors. The neurological deficit observed in our animals, from day 1 post-treatment with L-BMAA, could be due to an initial activation of glutamate receptors leading to excitotoxicity.

The Rota-rod test at 15 rpm and the footprint test results suggested that there were certain difficulties in motor coordination of treated animals, leading us to further

investigation in order to check specifically if muscles were functional or not. These findings were in agreement with those obtained at the initial stages of the disease in the SOD1 transgenic murine model of familial ALS (Naor et al., 2009).

At the moment, SOD1 deficient murine model is the most accepted one to study ALS (Gurney, 1994; Nagai et al., 2001). However, in this model symptoms evolve very quickly from disease debut; so, an irreversible state is reached in a very short period of time. In our case, although the initial excitotoxicity is high, the neurological symptoms are appearing gradually and a worsening not becomes lethal, allowing us to study the evolution of the pathology.

The electron microscopy pictures confirm that motor neurons were affected at the lumbar spinal cord in treated animals. We observed abundant endoplasmic reticulum fragmentation and numerous free polyribosomes which are in agreement with the stress suffered by this organelle described in ALS due to the accumulation of misfolded proteins (Urano et al., 2000; Murch et al., 2004; Igaz et al., 2011). It has been reported that endoplasmic reticulum stress plays a central role in ALS pathogenesis. Moreover, endoplasmic reticulum stress also occurs in spinal cord tissue of sporadic ALS patients and, recently, it has been suggested that endoplasmic reticulum disassemblment could also occur in ALS cases associated with altered TDP-43 (Walker and Atkin, 2011). Okle et al. (2012) reported that SH-SY5Y cells treated with low L-BMAA concentrations showed a dysregulation of the cellular protein homeostasis with ensuing endoplasmic reticulum stress that is independent from high concentration effects such as excitotoxicity and oxidative stress.



**Fig. 7 – (A)** Assay of TDP-43 by Western Blot in cerebral cortex of control and L-BMAA treated rats. Urea extracts were analyzed by immunoblotting with anti TDP-43 as indicated in 2.10. Several different species of TDP-43 could be observed, including bands corresponding to normal TDP-43 (+) and bands corresponding to high molecular forms of TDP-43 (++). **(B)** Protein bands were scanned and quantified using Multigauge Image software v3.0. The immunoblots were representative of one of three experiments with similar results. These results were quantified in arbitrary units and were represented in the attached graph as means  $\pm$  S.E.M. (\* $p$ -value < 0.05).

Mitochondria plays a complex role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases due to their involvement in a vast number of processes, including the regulation of excitotoxicity, the homeostasis of intracellular calcium, the production of reactive oxygen species and apoptotic processes (Lezi and Swerdlow, 2012). Our results showed swelling, vacuolization and disrupted mitochondria of spinal cord motor neurons of L-BMAA treated animals. These results were consistent with data found in studies related with ALS pathology (Costa et al., 2010). Mitochondrial dysfunction can trigger or propagate neurodegeneration and so it can be critically important for ALS development. Moreover, it is known that  $\text{Ca}^{2+}$  overload in neurons causes cell death. L-BMAA activation of glutamate receptors increases cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, therefore mitochondria greedily accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  resulting in osmotic swelling and rupture of the outer mitochondrial membrane

(Chiu et al., 2011). In addition, it is a well-known fact that mitochondrial damage induces apoptosis and caspase-3 activation. Our results point those caspase-3 increases in the perinuclear area of spinal cord motor neurons induced by L-BMAA treatment.

Recent reports suggest that progressive motor neuron death in ALS may involve non-neuronal cells such as glial cells and skeletal muscle (Yoo and Ko, 2011). On the other hand, Sica et al. (2011) suggest that astrocytes may be the primary target hosting a still unknown external agent in ALS aetiology and pathogenesis. Apoptotic oligodendrocytes may reflect that glia is also affected, an issue which is also studied in other works that relate this dysfunction with neuronal alterations in neurodegenerative diseases (King et al., 2011). In addition, other authors have found morphological and biochemical myelin degeneration in lumbar and sacral sections of spinal cord of SOD1 rats (Niebroj-Dobosz et al., 2007). In our experiments we have seen oligodendrocytes with typical apoptotic nuclei in lumbar spinal cord from L-BMAA treated rats. However further study is required to deepen this point.

We have quantified NAA, Cr and Cho amounts. NAA is localized primarily in neurons and so its concentration in the brain is directly related to neuronal density, metabolism and functional status. Cr, which consists of creatine and phosphocreatine, indicates the status of cellular energy. Cho come from the brain cell membrane components glycerophosphocholine, phosphocholine and free choline, and provides information on membrane structural integrity, synthesis and degradation. Alterations in these metabolites have been used in the ALS diagnosis in humans (Rooney et al., 1998; Álvarez-Uría Tejero et al., 2011). This way, NAA decreases in L-BMAA treated rats. NAA/Cho, NAA/Cr and NAA/Cho + Cr ratios trend to decrease in lumbar spinal cord as well (Table 2). Our data are compatible with motor neuron diseases such as ALS.

On the other hand, it is known that neuronal damage appears together with an enhancement of glial activity, reflected by an increase in myoinositol (mIns) spectrum (Kalra and Arnold, 2006; Kalra et al., 2006). However, we have not found any variation in mIns spectrum yet, nor in lumbar spinal cord neither in motor cerebral cortex (data not show).

In the last few years, a big effort has been done to find biomarkers of neurodegenerative diseases. Therefore, we are interested in the measurement of GSK3 $\beta$  and TDP-43.

GSK3 exists as two isoforms, GSK3 $\alpha$  and GSK3 $\beta$ , which are inactivated by phosphorylation of Ser 21 (GSK3 $\alpha$ ) and Ser 9 (GSK3 $\beta$ ) (Sutherland et al., 1993). The increase of GSK3 $\beta$  is related to neurodegenerative diseases, especially to Alzheimer's disease. However, sometimes increased levels of GSK3 $\beta$  have been found in ALS. An increased level of expression of GSK3 $\beta$  has been described in frontal and temporal cortex of ALS patients with cognitive impairment (Yang et al., 2008). In this regard, our results evidence that through the mechanism of toxicity of L-BMAA, an increase in the synthesis of total GSK3 $\beta$  can occur in both lumbar spinal cord and motor cortex. GSK3 $\beta$  is active under normal resting conditions. However, L-BMAA treatment also increases the levels of the inactive form P-(Ser9)-GSK3 $\beta$ . Since the difference between total GSK3 $\beta$  and P-(Ser 9) GSK3 $\beta$  is higher in the motor cortex of animals treated with L-BMAA than in the control animals, a net increase of GSK3 $\beta$  activity is indicated.

Current ALS research has focused on the role of TDP-43 in neurodegeneration (Igaz et al., 2011). L-BMAA can bind to serine-tRNA and is incorporated into the polypeptide chain, the protein can no longer fold properly (Holtcamp, 2012). Clumps of misfolded proteins may form the aggregates that characterize neurodegenerative diseases. Our data suggest that L-BMAA increases high molecular forms of TDP-43, which could be produced by the addition of this amino acid to the TDP-43 protein. On the other hand, we have also observed basal levels of TDP-43 aggregates in control animals, which can be due to sample handling.

In view of the reported results, the major advantage of this possible sporadic ALS model is the slow progression of the disease. Thence the evolution of the animals can be observed more precisely. Furthermore, potential therapeutic drugs can be tested. It would be a relevant success if some of the ALS symptoms could revert.

## 5. Conclusions

We introduce a treatment based on the i.p. injection of the neurotoxic amino acid L-BMAA, using a dosage comprised between 200 and 350 mg/kg/day for 5 consecutive days at weaning time. Through this treatment, we obtained animals that display a neurological impairment compatible with sporadic ALS symptoms. These animals have ultrastructural alterations in both the ER and mitochondria, and present significant decreases in the NAA/Cho, NAA/Cr and NAA/Cho + Cr ratios. Everything points to an important neuronal damage in motor cortex and lumbar spinal cord. Moreover, the high molecular weight forms of TDP-43 remarkably increase, as a hallmark of ALS. Therefore this treatment could be the first step towards an experimental model for sporadic ALS.

## Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

We wish to express our gratefulness to NMR – ESR Center (UCM) and to Electron Microscopy Center (UCM) for their expert technical assistance. This work was supported by MINECO (PPT-300000-2009-11) and FUNDELA Foundation.

## REFERENCES

Abdulla, E.M., Campbell, I.C., 1993. L-BMAA and kainate-induced modulation of neurofilament concentrations as a measure of neurite outgrowth: implications for an in vitro test of neurotoxicity. *Toxicol. In Vitro* 7 (4), 341–344.

Abel, E.L., 2007. Football increases the risk for Lou Gehrig's disease amyotrophic lateral sclerosis. *Percept. Mot. Skills* 104, 1251–1254.

Álvarez-Uría Tejero, M.J., Sáiz Ayala, A., Fernández Rey, C., Santamarta Liébana, M.E., Costilla García, S., 2011. Diagnóstico de la esclerosis lateral amiotrófica: avances en RM. *Radiología* 53, 146–155.

Aoki, M., Warita, H., Mizuno, H., Suzuki, N., Yuki, S., Itoyama, Y., 2011. Feasibility study for functional test battery of SOD transgenic rat (H46R) and evaluation of edaravone a free radical scavenger. *Brain Res.* 1382, 321–325.

Banack, S.A., Johnson, H.E., Cheng, R., Cox, P.A., 2007. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacterium. *Mar. Drugs* 5 (4), 180–196.

Bradley, W.G., Cox, P.A., 2009. Beyond Guam: cyanobacteria, BMAA and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10 (Suppl. 2), 5–6.

Brand, L.E., Pablo, J., Compton, A., Hammerschlag, N., Mash, D.C., 2010. Cyanobacterial blooms and the occurrence of the neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in South Florida Aquatic Food Webs. *Harmful Algae* 1, 620–635.

Brettschneider, J., Van Deerlin, V.M., Robinson, J.L., Kwong, L., Lee, E.B., Ali, Y.O., Safren, N., Monteiro, M.J., Toledo, J.B., Elman, L., McCluskey, L., Irwin, D.J., Grossman, M., Molina-Porcel, L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., 2012. Pattern of ubiquitin pathology in ALS and FTL indicates presence of C9ORF72 hexanucleotide expansion. *Acta Neuropathol.* 123 (6), 825–839.

Brownson, D.M., Mabry, T.J., Leslie, S.W., 2002. The cycad neurotoxic amino acid, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), elevates intracellular calcium levels in dissociated rat brain cells. *J. Ethnopharmacol.* 82 (2–3), 159–167.

Buenz, E.J., Howe, C.L., 2007. Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *Neurotoxicology* 28 (3), 702–704.

Caller, T.A., Field, N.C., Chipman, J.W., Shi, X., Harris, B.T., Stommel, E.W., 2012. Spatial clustering of amyotrophic lateral sclerosis and the potential role of BMAA. *Amyotroph. Lateral Scler.* 13 (1), 25–32.

Chang, Y.C., Chiu, S.J., Kao, K.P., 1993. Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) decreases brain glutamate receptor number and induces behavioral changes in rats. *Chin. J. Physiol.* 36 (2), 79–84.

Chiò, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R., Mora, G., 2005. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain* 128 (Pt. 3), 472–476.

Chiu, A.S., Gehring, M.M., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2011. Does  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid (BMAA) play a role in neurodegeneration? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8 (9), 3728–3746.

Chiu, A.S., Gehring, M.M., Braid, N., Guillemin, G.J., Welch, J.H., Neilan, B.A., 2012. Excitotoxic potential of the cyanotoxin  $\beta$ -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicon* 60 (6), 1159–1165.

Costa, J., Gomes, C., de Carvalho, M., 2010. Diagnosis, pathogenesis and therapeutic targets in amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* 9 (6), 764–778.

Cox, P.A., Sacks, O.W., 2002. Cycad neurotoxins: consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 58 (6), 956–959, 26.

Cox, P.A., Banack, S.A., Murch, S.J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R.R., Metcalf, J.S., Morrison, L.F., Codd, G.A., Bergman, B., 2005. Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (14), 5074–5078.

Cox, P.A., Richer, R., Metcalf, J.S., Banack, S.A., Codd, G.A., Bradley, W.G., 2009. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph. Lateral Scler.* 10 (Suppl. 2), 109–117.

Cruz-Aguado, R., Winkler, D., Shaw, C.A., 2006. Lack of behavioral and neuropathological effects of dietary beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2), 294–299.

Cucchiaroni, M.L., Viscormi, M.T., Bernardi, G., Molinari, M., Guatteo, E., Mercuri, N.B., 2010. Metabotropic glutamate receptor 1 mediates the electrophysiological and toxic actions



- of the cycad derivative beta-N-methylamino-L-alanine on substantia nigra pars compacta DAergic neurons. *J. Neurosci.* 30 (15), 5176–5188.
- Davison, A.N., Dobbing, J., 1968. The developing brain and vulnerable periods in developing brain. In: Davison, A.N., Dobbing, J. (Eds.), *Applied Neurochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 253–316.
- Duncan, M.W., Steele, J.C., Kopin, I.J., Markey, S.P., 1990. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 40 (5), 767–772.
- Esterhuizen, M., Downing, T.G., 2008. Beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in novel South African cyanobacterial isolates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71 (2), 309–313.
- Goto, J.J., Koenig, J.H., Ikeda, K., 2012. The physiological effect of ingested  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine on a glutamatergic synapse in an in vivo preparation. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 156 (3–4), 171–177.
- Gurney, M.E., 1994. Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 331 (25), 1721–1722.
- Holtkamp, W., 2012. The emerging science of BMAA: do cyanobacteria contribute to neurodegenerative disease? *Environ. Health Perspect.* 120, 110–116.
- Igaz, L.M., Kwong, L.K., Lee, E.B., Chen-Plotkin, A., Swanson, E., Unger, T., Malunda, J., Xu, Y., Winton, M.J., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2011. Dysregulation of the ALS-associated gene TDP-43 leads to neuronal death and degeneration in mice. *J. Clin. Invest.* 121 (2), 726–738.
- Jonasson, S., Eriksson, J., Berntzon, L., Spáčil, Z., Ilag, L.L., Ronnevi, L.O., Rasmussen, U., Bergman, B., 2010. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 9252–9257.
- Kalra, S., Arnold, D.L., 2006. Magnetic resonance spectroscopy for monitoring neuronal integrity in amyotrophic lateral sclerosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 576, 275–282.
- Kalra, S., Hanstock, C.C., Martin, W.R., Allen, P.S., Johnston, W.S., 2006. Detection of cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Neurol.* 63, 1144–1148.
- Karamyan, V.T., Speth, R.C., 2008. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci.* 82 (5–6), 233–246.
- Karlsson, O., Lindquist, N.G., Brittebo, E.B., Roman, E., 2009a. Selective brain uptake and behavioral effects of the cyanobacterial toxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) following neonatal administration to rodents. *Toxicol. Sci.* 109 (2), 286–295.
- Karlsson, O., Roman, E., Brittebo, E.B., 2009b. Long-term cognitive impairments in adult rats treated neonatally with beta-N-methylamino-L-alanine. *Toxicol. Sci.* 112 (1), 185–195.
- Karlsson, O., Berg, A.L., Lindström, A.K., Arnerup, G., Roman, E., Bergquist, J., Hanrieder, J., Lindquist, N.G., Brittebo, E., Andersson, M., 2012. Neonatal exposure to the cyanobacterial toxin BMAA induces changes in protein expression, and neurodegeneration in adult hippocampus. *Toxicol. Sci.* 130 (2), 391–404.
- King, A.E., Dickson, T.C., Blizzard, C.A., Woodhouse, A., Foster, S.S., Chung, R.S., Vickers, J.C., 2011. Neuron-glia interactions underlie ALS-like axonal cytoskeletal pathology. *Neurobiol. Aging* 32 (3), 459–469.
- Lee, V.M., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., 2011. Gains or losses: molecular mechanisms of TDP 43-mediated neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 38–50.
- Lezi, E., Swerdlow, R.H., 2012. Mitochondria in neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 942, 269–286.
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., Lobner, D., 2009. beta-N-methylamino-L-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc(–). *Exp. Neurol.* 217 (2), 429–433.
- Liu-Yesucevitz, L., Bilgutay, A., Zhang, Y.J., Vanderwyde, T., Citro, A., Mehta, T., Zaarur, N., McKee, A., Bowser, R., Sherman, M., Petrucelli, L., Wolozin, B., 2010. Tar DNA binding protein-43 (TDP-43) associates with stress granules: analysis of cultured cells and pathological brain tissue. *PLoS ONE* 5, e13250.
- Lobner, D., Piana, P.M.T., Salous, A.K., Peoples, R.W., 2007. [beta]-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 25, 360–366.
- Matsuoka, Y., Rakonczay, Z., Giacobini, E., Naritoku, D., 1993. L-Beta-methylamino-alanine-induced behavioral changes in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 44 (3), 727–734.
- Metcalfe, J.S., Banack, S.A., Lindsay, J., Morrison, L.F., Cox, P.A., Codd, G.A., 2008. Co-occurrence of beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid with other cyanobacterial toxins in British waterbodies, 1990–2004. *Environ. Microbiol.* 10 (3), 702–708.
- Mondo, K., Hammerschlag, N., Basile, M., Pablo, J., Banack, S.A., Mash, D.C., 2012. Cyanobacterial neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA) in shark fins. *Mar. Drugs* 10 (2), 509–520.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., Seeburg, P.H., 1994. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12, 529–540.
- Murch, S.J., Cox, P.A., Banack, S.A., Steele, J.C., Sacks, O.W., 2004. Occurrence of beta-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.* 110 (4), 267–269.
- Myers, T.G., Nelson, S.D., 1990. Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by  $^{13}\text{C}$  NMR. *J. Biol. Chem.* 265 (18), 10193–10195.
- Nagai, M., Aoki, M., Miyoshi, I., Kato, M., Pasinelli, P., Kasai, N., Brown Jr., R.H., Itoyama, Y., 2001. Rats expressing human cytosolic copper-zinc superoxide dismutase transgenes with amyotrophic lateral sclerosis: associated mutations develop motor neuron disease. *J. Neurosci.* 21 (23), 9246–9254.
- Naor, S., Keren, Z., Bronshtein, T., Goren, E., Machluf, M., Melamed, D., 2009. Development of ALS-like disease in SOD-1 mice deficient of B lymphocytes. *J. Neurol.* 256 (8), 1228–1235.
- Niebroj-Dobosz, I., Rafałowska, J., Fidziańska, A., Gadamski, R., Grieb, P., 2007. Myelin composition of spinal cord in a model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in SOD1G93A transgenic rats. *Folia Neuropathol.* 45 (4), 236–241.
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., Dietrich, D.R., 2012. L-BMAA induced ER-stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low non-excitotoxic concentrations. *Toxicol. Sci.* 130 (2), 391–404.
- Papapetropoulos, S., 2007. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.* 50 (7–8), 998–1003.
- Perry, T.L., Bergeron, C., Biro, A.J., Hansen, S., 1989. Beta-N-methylamino-L-alanine. Chronic oral administration is not neurotoxic to mice. *J. Neurol. Sci.* 94 (1–3), 173–180.
- Polsky, F.I., Nunn, P.B., Bell, E.A., 1972. Distribution and toxicity of alpha-amino-beta-methylaminopropionic acid. *Fed. Proc.* 31 (5), 1473–1475.
- Rakonczay, Z., Matsuoka, Y., Giacobini, E., 1991. Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J. Neurosci. Res.* 29 (1), 121–126.
- Rooney, W.D., Miller, R.G., Gelinis, D., Schuff, N., Maudsley, A.A., Weiner, M.W., 1998. Decreased N-acetylaspartate in motor cortex and corticospinal tract in ALS. *Neurology* 50 (6), 1800–1805.

- Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., Arias, C., 2011. GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *Int. J. Alzheimer Dis.* 2011, 189728.
- Santiago, M., Matarredona, E.R., Machado, A., Cano, J., 2006. Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis. *Toxicol. Lett.* 167 (1), 34–39.
- Seawright, A.A., Brown, A.W., Nolan, C.C., Cavanagh, J.B., 1990. Selective degeneration of cerebellar cortical neurons caused by cycad neurotoxin, L-beta-methylaminoalanine (L-BMAA), in rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 16 (2), 153–169.
- Sica, R.E., Incola, A.F., Deniselle, M.C., Rodriguez, G., Monachelli, G.M., Peralta, L.M., Bettini, M., 2011. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: new hypothesis regarding its etiology and pathogenesis suggests that astrocytes might be the primary target hosting a still unknown external agent. *Arq. Neuropsiquiatr.* 69 (4), 699–706.
- Smith, Q.R., Nagura, H., Takada, Y., Duncan, M.W., 1992. Facilitated transport of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 58, 1330–1337.
- Spencer, P.S., Hugon, J., Ludolph, A., Nunn, P.B., Ross, S.M., Roy, D.N., Schaumburg, H.H., 1987a. Discovery and partial characterization of primate motor-system toxins. *Ciba Found. Symp.* 126, 221–238.
- Spencer, P.S., Nunn, P.B., Hugon, J., Ludolph, A.C., Ross, S.M., Roy, D.N., Robertson, R.C., 1987b. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 237 (4814), 517–522.
- Spencer, P.S., Lasarev, M.R., Palmer, V.S., Kisby, G.E., 2010. Neurotoxic cycad components and Western Pacific ALS/PDC. *Ann. Neurol.* 68 (6), 975–976.
- Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P., 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signaling. *Biochem. J.* 296, 15–19.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., Ron, D., 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.
- Walker, A.K., Atkin, J.D., 2011. Stress signaling from the endoplasmic reticulum: a central player in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *IUBMB Life* 63 (9), 754–763.
- Weiss, J.H., Choi, D.W., 1988. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 241, 973–975.
- Winton, M.J., Igaz, L.M., Wong, M.M., Kwong, L.K., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M., 2008. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J. Biol. Chem.* 283, 13302–13309.
- Yang, W., Leystra-Lantz, C., Strong, M.J., 2008. Upregulation of GSK3 $\beta$  expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res.* 1196, 131–139.
- Yoo, Y.E., Ko, C.P., 2011. Treatment with trichostatin A initiated after disease onset delays disease progression and increases survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 231 (1), 147–159.